VIRUSSPEZIFISCHE PROTEINSYNTHESE NACH INFEKTION VON B. SUBTILIS MIT SPP1

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereichs Biologie (23)
der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Helmut Esche
aus Berlin

Berlin 1974

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546513_0107

VIRUSSPEZIFISCHE PROTEINSYNTHESE NACH INFEKTION VON B. SUBTILIS MIT SPP1

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereichs Biologie (23)
der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Helmut Esche

aus Berlin

Berlin 1974

1. Gutachter: Professor Dr. T. A. Trautner

2. Gutachter: Professor Dr. E. R. Lochmann

Tag der mündlichen Prüfung: 25. 11. 1974

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik in Berlin-Dahlem in der Zeit von Januar 1972 bis November 1974 angefertigt.

Herrn Professor Dr. T. A. Trautner und Herrn Dr. M. Schweiger danke ich für ihre großzügige Unterstützung und die engagierte wissenschaftliche Betreuung. Besonderer Dank gilt ferner Herrn Dr. G. Klotz für viele anregende Gespräche zu dieser Arbeit. Diskussionen mit Herrn Dr. P. Herrlich, Dr. W. Messer und das freundliche Entgegenkommen der Mitarbeiter der Abteilung Trautner waren mir eine große Hilfe.

Der Max-Planck-Gesellschaft bin ich für die Gewährung eines Doktoranden-Stipendiums zu Dank verpflichtet.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1. Zusammenfassung		1
2. Einleitung		3
3. Material und Methoden		6
3.1	Abkürzungen	6
3.2	Medien und Platten	8
3.3.	Bakterien und Bakteriophagen	9
3.4	Puffer/Lösungen	10
3.5	Chemikalien/Substanzen	11
3.6.	Mutagenese und Isolierung von Amber-Mutanten	12
	3.6.1 Mutagenese	12
	3.6.2 Isolierung von Amber-Mutanten	12
3.7	Komplementation	13
3.8	Phagenwachstum und Phagenpräparation	13
	3.8.1 Herstellung von SPP1 WT-Lysaten	13
	3.8.2 Herstellung von Amber-Phagen-Lysaten	14
	3.8.3 Herstellung von ^{14}C-Protein-markierten SPP1 WT-Lysaten	14
3.9	Markierung und Charakterisierung von SPP1 DNA	15
	3.9.1 ^{3}H(Methyl-) Thymidin-Markierung	15
	3.9.2 Präparation von Lysaten	15
	3.9.3.Sucrosegradientenzentrifugation	16

		Seite
3.10	Markierung SPP1 spezifischer Proteine	16
	3.10.1 durch Dauermarkierung	16
	3.10.2 durch Pulsmarkierung	17
3.11	Präparation markierter Proteine für die Gelelektrophorese	17
3.12	Gelelektrophorese	19
3.13	Auswertung der Gele	20
	3.13.1 durch Autoradiographie	20
	3.13.2 durch Färben der Proteine	20
3.14	Dissoziation von SPP1 in die Strukturkomponenten Kopf und Schwanz	21
	3.14.1 durch DMSO-Behandlung	21
	3.14.2 durch EDTA-Behandlung	21
3.15	Trennung der Strukturkomponenten im Sucrosegradienten	21
3.16	Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Phagenstrukturkomponenten	22
3.17	Induktion und Nachweis der Glycerolphosphat-Dehydrogenase	22
	3.17.1 Induktion der GPD	22
	3.17.2 Präparation des Enzymextraktes	23
	3.17.3 Enzymnachweis	23
3.18	In vitro Nachweis der RNA Polymerase	23
	3.18.1 Präparation der RNA Polymerase im Rohextrakt	23
	3.18.2 In vitro RNA Polymerase Test	24

Seite

4. Experimente und Ergebnisse 25

4.1 Versuche zur selektiven Hemmung der Wirtsproteinsynthese 26

4.1.1 durch UV-Behandlung 27

4.1.2 durch Rifampicin 30

4.2 SPP1 spezifische Proteine 33

4.2.1 Strukturproteine 34

4.2.1.1 Proteine der Phagenkopf- und Phagenschwanz-Struktur 37

4.2.2 Identifizierung SPP1 induzierter Proteine 39

4.2.2.1 durch Vergleich des Proteinmusters von SPP1·R und SPP1.168 infizierten B. subtilis Zellen 40

4.2.2.2 durch amber Mutanten von SPP1 42

4.3 Untersuchungen über die Regulation SPP1 induzierter Proteine 48

4.3.1 Zeitlicher Verlauf der Synthese von SPP1-Proteinen 49

4.3.2 Abhängigkeit der Expression später Gene von der DNA-Replikation 52

4.3.2.1 Untersuchung der Phagen DNA-Replikation nach Infektion mit amber 109 54

4.3.2.2 Hemmung der Expression später Phagengene durch HPUra 56

Seite

4.4 Untersuchungen zur Regulation wirts-induzierter Proteine nach Infektion 61

4.4.1 Zeitlicher Verlauf der Synthese von Wirtsproteinen 61

4.4.2 Induktion und Nachweis von GPD nach Infektion 63

5. Diskussion 66

5.1 SPP1 spezifische Proteine 66

5.2 Regulation der Genexpression von SPP1 69

5.3 Abhängigkeit der SPP1 Entwicklung von Wirtsfunktionen 74

6. Literatur 77

1. Zusammenfassung

(1) Der Phage SPP1 induziert in B. subtilis die Synthese von ca. 23 Proteinen, darunter 10 Strukturproteinen. Das Gesamtmolekulargewicht der gefundenen Phagenproteine beträgt etwa 1.17o.ooo Daltons, was ca. 9o % der genetischen Information der SPP1 DNA entspricht.

(2) Die SPP1 Proteine können entsprechend ihrem zeitlichen Erscheinen nach Infektion in eine Gruppe früher und zwei Gruppen später Proteine eingeteilt werden.

Die Synthese der frühen Proteine beginnt einige Minuten nach Infektion und wird bis auf die eines frühen Proteins spät in der Phagenentwicklung abgeschaltet. Die erste Gruppe der späten Proteine erscheint ca. 17 min, die zweite ca. 25 min nach Infektion. Alle späten Proteine werden bis zur Lyse gebildet.

(3) Die Expression der späten SPP1 Proteine scheint indirekt abhängig zu sein von einer normalen DNA Replikation. Es wurden keine späten Proteine gefunden nach spezifischer Inhiblerung der DNA-Replikation durch HPUra und nach Infektion mit einer amber Mutante, die unter nicht permissiven Bedingungen keine DNA Replikation zeigt.

(4) Die makromolekularen Synthesen des Wirts, B. subtilis , werden nach Infektion durch SPP1 nicht wesentlich beeinflußt.

(5) Die Expression SPP1 spezifischer Gene ist während der ganzen Phagenentwicklung abhängig von der Makromolekularsynthese des Wirts. Eine Hemmung der Ausprägung dieser Wirtsfunktion durch UV-Bestrahlung der Zellen vor oder durch Rifampicin-Gabe nach Infektion inhibiert die Phagenbildung.

2. Einleitung

Bakterienviren sind neben Plasmiden die kleinsten selbständig reproduktionsfähigen biologischen Strukturen. Sie besitzen zwar eine informationstragende Nukleinsäure, aber kein eigenes Enzymsystem, um diese genetische Information zu realisieren. Dies ist nur in Verbindung mit dem Synthesemechanismus einer lebenden Wirtszelle (Bakterienzelle) möglich, in die ihre genetische Information gelangen muß. Das durch Infektion in die Wirtszelle eingeführte Virusgenom induziert die Synthese von spezifischen Enzymen, die 1) für die Bildung aller Bausteine des Virus (Nukleinsäure, Hüllproteine) notwendig sind und 2) zelleigene Syntheseleistungen auf phagenspezifische umstellen. Gleichzeitig werden Syntheseprozesse der Zelle, die mit denen der Virusvermehrung in Konkurrenz stehen, gehemmt. Die Synthese dieser verschiedenen über die Virusinformation gebildeten Proteine unterliegt dabei einer meist sehr komplizierten Regulation. Die neugebildeten Bakterienviren werden entweder aktiv aus dem Wirt ausgeschleust oder durch Zerstörung der Wirtszelle mit Hilfe lytischer Enzyme frei.

Bakteriophagen-Wirts-Systeme haben sich beim Verständnis biologischer Prozesse auf molekularer Ebene, wie z. B. Vererbung, Wirkungsweise von Enzymen, Stoffwechselregulation, Prozessen, die auch für höhere Organismen von grundlegender Bedeutung sind, aus folgenden Gründen als besonders vorteilhaft erwiesen:

1) Phagen-Wirts-Systeme sind gegenüber anderen Systemen experimentell leicht zu handhaben.

2) Bakterienviren vermehren sich schnell.

3) Das Phagen-Wirts-System läßt sich leicht genetisch manipulieren. Fast in allen Phagen- wie in vielen Wirtsfunktionen können leicht Mutanten gefunden werden. Die biologisch-chemische Analyse dieser Mutanten gibt oft Auskunft über die molekularen Abläufe der biologischen Prozesse. So sind z. B. eine Reihe von Fragen der DNA Replikation, der genetischen Rekombination und der Regulation der Genexpression durch Vergleich genetischer und physiologischer Analysen geklärt worden.

Zu den bevorzugten Objekten gehörten hauptsächlich die großen DNA Phagen, wie z. B. die virulenten E. coli Phagen T4 und T2. Diese verfügen zwar im Vergleich zu ihrer Wirtszelle über ein eine bis zwei Größenordnungen kleineres genetisches Material, stellen jedoch vom Standpunkt des Molekularbiologen, der sämtliche Funktionen und Produkte eines Phagengenoms aufklären möchte, ein noch relativ kompliziertes System dar. Bei der Vermehrung eines großen DNA Phagen, wie des Phagen T4, werden in der Wirtszelle bis zu 70 für die Phagenreplikation unerläßliche Gene exprimiert (Kozloff, 1968), die durch komplizierte genetische Regulationsmechanismen kontrolliert werden. Es scheint deshalb schwierig, bei großen Phagen sämtliche Genprodukte und ihre gegenseitige Abhängigkeit in absehbarer Zeit aufzuklären und biochemisch zu charakterisieren. Diesem Ziel ist man bei den kleineren doppel- wie einzelsträngigen DNA-Phagen, z. B. T7, ϕ29 und ϕx174 erheblich näher gerückt.

Der in dieser Arbeit untersuchte Phage SPP1 gehört zu den kleineren virulenten B. subtilis Phagen. Er wurde von Riva und Mitarbeitern (1968) isoliert und weitgehend charakterisiert. Er besitzt eine doppelsträngige DNA mit einem Molekulargewicht von 25 x 10^6 Daltons, die sich in denaturiertem Zustand leicht mit Hilfe von Poly-UG oder ribosomaler RNA im Caesiumchlorid-Dichtegradienten in die komplementären Einzelstränge auftrennen läßt. Dies führte a) im Zusammenhang mit der Möglichkeit der Transfektion (Földes und Trautner, 1964) bei B. subtilis zu Untersuchungen der Genkonversion (Spatz und Trautner, 1970), einem molekularen Mechanismus, der nicht gepaarte Basen spezifisch erkennt und repariert und b) zu Untersuchungen der Strangspezifität der Transkription (Riva, 1969; Esche und Spatz, 1973).

Das Ziel dieser Arbeit war es, einen Beitrag zur Charakterisierung der biologischen Prozesse der Phagenentwicklung von SPP1 zu leisten. Nach Infektion auftretende Phagenproteine sollten durch Auftrennung nach ihrem Molekulargewicht in der Gel-Elektrophorese erfaßt werden. Weiterhin wurde angestrebt,

a) einen Einblick in die Regulation der Expression der Phagenproteine zu gewinnen und
b) die Abhängigkeit der Phagenfunktionen von Wirtsfunktionen zu untersuchen.

3. Material und Methode

3.1 Erläuterung der im Text gebrauchten Abkürzungen:

AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserum-Albumin
B. subtilis	Bacillus subtilis
cpm	Radioaktive Zerfälle pro Minute
CsCl	Caesiumchlorid
CTP	Cytosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfonid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreithol
EDTA	Äthylendiamin-tetraessigsäure, Dinatriumsalz
GP-Dehydrogenase	Glyzerolphosphat-Dehydrogenase
GTP	Guanosintriphosphat
HPUra	Hydroxyphenylazo-Uracil
HSA	Menschenserum-Albumin
moi	Multiplizität der Infektion
MTT	Dimethyl-thiazolyl-diphenyl-Tetrazolium-bromid
ODU	Optische Dichte-Einheit
PBS	Phenazin-Methosulfat
pfu	Plaque-bildende Einheit
PEP	Phosphoenolpyruvat

SDS	Natriumlaurylsulfat
TBT	Phagenpuffer
TCA	Trichloressigsäure
TEMET	Tetraethylmethylenadiamin
Tris	Trihydroxymethyl-Aminomethan
upm	Umdrehung pro Minute
UTP	Uridintriphosphat

3.2 Medien und Platten

Nutrient-Broth-Medium (NB) (Spatz und Trautner, 1971) wurde generell für Phagenlysate verwendet.

MIIM-Medium: 0,13 % $(NH_4)_2SO_4$, 0,14 % K_2HPO_4, 0.05 % KH_2PO_4, 0.29 % Na-Citrat x 2 H_2O; 0.15 % Asparagin, 0.01 M $MgSO_4$, 0,001 M $MnSO_4$ 10^{-6} M $FeCl_3$, 0.7 % Glycerin, 50 µg/ml Tryptophan, 0.2 % Vitaminlösung, 2 µg/ml von jeder Aminosäure. MIIM-Medium wurde bei der radioaktiven Markierung phagenspezifischer Proteine mit ^{14}C-markierten Aminosäuren benutzt.

MIIIS-Medium: 0.13 % $(NH_4)_2SO_4$, 0.14 % K_2HPO_4, 0.05 % KH_2PO_4, 0.29 % Na-Citrat x 2 H_2O, 0.15 % Asparagin, 0.01 M $MgSO_4$, 0.001 M $MnSO_4$, 5 µg/ml Leucin, 0.5 NB Medium. Dieses Minimalmedium wurde als Wachstumsmedium für den Suppressorstamm B. subtilis 101-B verwendet. Unter diesen Wachstumsbedingungen wurde gegen su^- Revertantenzellen selektiert.

Folgende Platten wurden benutzt:

NB	(Spatz und Trautner, 1971)
LTT	(Spatz und Trautner, 1970)
MIII-Minimalplatten	(Spizizen, 1958)

3.3 Bakterien und Bakteriophagen

In Tabelle 1 sind die verwendeten Bakterienstämme aufgeführt.

Tabelle 1: Bakterienstämme

Bezeichnung	Referenz
168	Spizizen (1958)
168-3 Thy^-	Kahmann (1974)
168 Rif^r	eigene Arbeit
MCB	Spatz und Trautner (1971)
101 B (su^+)	Okubo und Yanagida (1968)
R	Trautner et al. (1974)

In dieser Arbeit wurden folgende Phagenstämme benutzt:

a) SPP1 (Riva et al., 1968)

b) Temperatursensitive Mutanten von SPP1; ts6, ts3 (Klotz und Spatz, 1971)

c) Suppressor sensitive amber Mutanten von SPP1

   (1) am 109, am 99, am 82, am 117, am 92, am 61, am 100, am 118, am 114, am 106, am 62, am 87 (Behncke, 1973)

   (2) am 2, am 7, am 12, am 22, am 28, am31, am 70, am 86, am 155 (eigene Arbeit)

d) SPP1·R, ein auf dem modifizierenden B. subtilis Stamm R (r^+ m^+) gewachsener SPP1 Phage.

3.4 Puffer und Lösungen

a) Phagenpuffer TBT, 0.1 M Tris, 0.1 M NaCl, 0.01 M $MgCl_2$, pH 7.5

b) Tris(HCl)-Puffer, 1.5 M Tris, pH 8.8

c) Tris(HCl)-Puffer, 0.5 M Tris, pH 6.8

d) Tris(HCl)-Puffer, 0.1 M Tris, pH 7.4

e) Tris(HCl)-Puffer, 0.01 M Tris, pH 8.0

f) Tris(HCl)-Puffer, 0.08 M Tris, pH 7.9

g) Puffer E 1, 0.05 M Tris, 0.38 M Glycine, 0.002 MEDTA, 1 % SDS

h) Puffer E 2, 0.05 M Tris(HCl) (pH 6.8) 1 % SDS, 1 % Marcaptoäthanol, 0.002 M EDTA, 10 % Glycerol

i) Phosphatpuffer, MNa_2HPO_4, $MNaH_2PO_4$, pH 7.5

k) NaCl-EDTA-Puffer, 0.15 M NaCl, 0.1 M EDTA, pH 8.7

l) NaCl-EDTA-Puffer, 0.15 M NaCl, 10^{-3} M EDTA, pH 6.9

m) Vitaminlösung: pro 100 ml H_2O 0.2 mg Biotin, 2.0 mg Nicotinsäure, 1.0 mg Thiamin, 1.0 mg p-Aminobenzoesäure, 0.5 mg Panthothensäure, 5,0 mg Pyridoxamin, 2.0 mg Cyanocobalamin.

3.5 Chemikalien/Substanzen

Caesiumchlorid, DMSO, Merkaptoäthanol	Merck
Acrylamid, Bis-Acrylamid, TEMED,	
Amoniumpersulfat, EDTA, Pronase, Brij	Serva
Tris-Base, Sucrose (RNase-frei)	Schwarz/Mann
DNase, Lysozyme	Worthington
	Biochemical Corp.
SDS	Bio-Rad
GTP, ATP, CTP, UTP, PEP, BSA, HSA,	
L-α-Glycerol-3-phosphat	Boehringer
Rifampicin, Actinomycin	Calbiochem.
Chloramphenicol	Sigma
MTT, PMS	Ferak-Chemie
HPUra ^{14}C-markiertes Aminosäure-Mix	New England Nuclear
^{3}H(Methyl)-Thymidin, ^{3}H(Methyl)-Uridin	Radiochemical
	Centre Amersham

3.6 Mutagenese und Isolierung von amber Mutanten

3.6.1 Mutagenese: Amber Mutanten wurden nach Mutagenese von Wildtyp-phagen mit Hydroxylamin (Tessman, 1968) isoliert. 1×10^{11} Phagen in TBT wurden mit einer Mutageneselösung aus 0.4 M Hydroxylamin, 0.05 M Na-Phosphatpuffer, 0.01 M $MgCl_2$, 0.001 M EDTA, pH 6.0, auf das 10-fache verdünnt und bei 37^{o} für 30 h inkubiert. Die mutagene Behandlung wurde durch 100-fache Verdünnung in TBT bei 0^{o} beendet und das Hydroxylamin durch Dialyse gegen TBT entfernt. Die Zahl der Überlebenden betrug nach 30 h Mutagenese ca. 1 %; der Prozentsatz der aufgetretenen Plaquetypmutanten ca. 1 % der Überlebenden.

3.6.2 Isolierung der amber Mutanten: Die mutagenisierten Phagen wurden mit B. subtilis 101-B (su^{+}) auf NB-Platten bei 37^{o} inkubiert. Von diesen Ausgangsplatten wurden Plaques abgenommen und replika-plattiert: unter nicht selektiven Bedingungen auf 101 B (su^{+}) und unter selektiven Bedingungen auf MCB (su^{-}). Die Phagen von ca. 0.3 % der Plaques, die von der Ausgangsplatte abgenommen wurden, führten zu keiner Plaquebildung auf MCB (su^{-}) Zellen und zeigten damit die erwarteten Eigenschaften von amber Mutanten. Die WT-Revertanten-sätze der Mutanten lagen in der Regel zwischen 1×10^{-4} und 1×10^{-6}.

3.7 Komplementation

Um festzustellen, wie vielen funktionellen Einheiten (Cistren) die isolierten Mutanten zuzuordnen sind, wurden Komplementationsversuche vorgenommen. Dabei wurde eine Referenzmutante in verschiedenen Konzentrationen (10^5 - 10^7 pfu/ml) mit Bakterien des Genotyps su^- ausplattiert. Auf die gleichen Platten wurde nach etwa 30' ein Tropfen einer zweiten Mutante, ebenfalls in verschiedenen Konzentrationen (10^4 - 10^6 pfu/ml) gegeben. Die Platten wurden für 8 - 10 h bei 37° inkubiert. Trat an der Stelle, an der die zweite Mutante auf den mit der ersten Mutante infizierten Bakterienrasen getropft worden war, Lyse auf, so wurden diese beiden Mutanten verschiedenen Komplementationsgruppen zugeordnet. Wenige Plaques (Revertanten oder Rekombinanten) oder Ausbleiben einer Lyse bedeuteten dagegen, daß die Mutanten in einer Komplementationsgruppe lagen.

3.8 Phagenwachstum und Phagenpräparation

3.8.1 Herstellung von Wildtyp-Phagen-Lysaten. Unmarkierte SPP1-Phagen für Infektionszwecke wurden in NB-Medium auf *B. subtilis* 168 bei 37° gezogen. Bei einem Bakterientiter von 2×10^8 Zellen/ml wurde mit einer moi von 1 infiziert. Nach etwa 150' - 180' lysierte die Kultur.

Die Phagen wurden aus dem Lysat durch Differentialzentrifugation und Zentrifugation in einem vorgeformten CsCl-Stufengradienten

(ρ [g/ml] 1.7, 1.5, 1.3, Beckmann SW 41 Rotor, 25.000 upm. 2.5 h, 4°) gewonnen. Die gereinigten und konzentrierten Phagen wurden gegen TBT dialysiert.

3.8.2 Herstellung von amber-Phagen-Lysaten. Zellen des Suppressor-Stammes B. subtilis 101-B wurden über Nacht in MIIS-Minimalmedium gezogen. Unter diesen Wachstumsbedingungen wird gegen su^- Zellen selektiert. Vor der Infektion mit einem amber-Phagen wurden die Zellen der stationären Übernachtkultur abzentrifugiert und in NB-Medium resuspendiert. Um eine Verunreinigung der amber-Phagen-Lysate mit Wildtyprevertanten niedrig zu halten, wurden die Zellkulturen stets nur durch Phagen eines einzigen Plaques infiziert. Nach 6 - 8 h Inkubation bei 37° lysierten die Kulturen. Die Phagenkonzentrationen lagen zwischen 10^9 bis 10^{10} infektiöser Partikel/ml. Der Revertantensatz war in der Regel kleiner als 10^{-5}. Die Phagen wurden aus den Lysaten, wie unter 3.7.1 beschrieben, gewonnen.

3.8.3 Herstellung von ^{14}C-Protein-markierten Phagen-Lysaten. Aus einer Übernachtkultur wurden B. subtilis 168 1 : 500 in MIIM-Medium eingeimpft, bei 37° bis zu einer Zelldichte von 2×10^8 Zellen/ml gezogen und mit einer Multiplizität von 5 mit SPP1 infiziert. Um eine kontinuierliche Aufnahme von ^{14}C-markierten Aminosäuren während der Phagenentwicklung zu erreichen, wurde zum Zeitpunkt der Infektion der Kultur 1.5 % NB-Medium hinzugegeben. Die ^{14}C-markierte Aminosäure-Mischung wurde 7' nach Infektion hinzupipettiert (Endkonzentration 5 µCi/ml), zu einer Zeit, zu der die

Synthese der Hüllproteine beginnt. Nach Eintreten der Lyse wurden die Phagen aus dem Lysat präpariert.

3.9 Markierung und Charakterisierung von SPP1 DNA

3.9.1 Markierung von SPP1-DNA mit ^{3}H(Methyl)-Thymidin. MIIIM-Medium, das 100 µg Thymin/ml enthielt, wurde mit B. subtilis 168 - 3 Thy^{-} geimpft und bei 37^{o} bis zu einer Zelldichte von 2 x 10^{8} Zellen/ml geschüttelt. Die Zellen wurden abzentrifugiert, mit MIIIM gewaschen und im gleichen Volumen MIIIM-Medium mit 5 µg Thymin/ml resuspendiert. Der Kultur wurde jetzt 20 µCi ^{3}H-Thymidin/ml zugesetzt und infiziert. 7' und 20' nach Infektion wurden der Kultur 5 ml Proben entnommen und, wie unter 3.9.2 folgt, aufgearbeitet.

3.9.2 Präparation von Lysaten für die Sucrosegradientzentrifugation. Zur Präparation von Lysaten nach Markierung der SPP1 DNA mit ^{3}H-Thymidin wurde eine von Kahmann (Diss., 1974) beschriebene Methode benutzt. Die der Kultur nach 7' und 20' entnommenen 5 ml Proben wurden mit gleichen Volumen einer Lösung von 0.1 M EDTA, 0.15 M NaCl, pH 8.5 und 0^{o} versetzt. NaCN wurde in einer finalen Konzentration von 0.01 M hinzugegeben und die Zellen sedimentiert (SS 34 Rotor, 5', 10.00 upm, 0^{o}). Das Sediment wurde mit 20 ml einer Lösung von 0.1 M EDTA, 0.15 M NaCl, pH 8.5 bei 0^{o} gewaschen, in 0.8 ml Lysispuffer (0.001 M EDTA, 0.15 M NaCl, pH 6.9) resuspendiert und 20 mg/ml Lysozym zugesetzt. Nach 40' Inkubation bei 0^{o} mit 4 x 1' Unterbrechungen

bei 37° wurden 0.2 ml einer 10 %igen SDS Lösung hinzugegeben und die Proben weitere 20' bei 60° inkubiert. Dem Lysat wurde jetzt 0.1 ml Pronaselösung (10 mg/ml) hinzugesetzt und bei 48° für 2 h vorsichtig geschüttelt. Die mit ^{3}H(Methyl)-Thymidin markierte DNA wurde anschließend durch Auflegen des Lysates auf einen Sucrosegradienten und Zentrifugation analysiert.

3.9.3 Sucrosegradientenzentrifugation: Die Sucroselösungen für den 5 bis 20 %igen linearen Gradienten enthielten 0.01 M EDTA und 0.5 M NaCl. Ein 60 %iges Sucrosekissen am Boden des Gradienten verhinderte den Verlust schnell sedimentierenden Materials. Zentrifugiert wurde in einem Beckman SW 50 L Rotor bei 20°; die Zentrifugationszeit bei 45.000 rpm betrug 2 h. Die Gradienten wurden vom Boden her in ca. 25 Fraktionen zu 0.2 ml ausgetropft und die Radioaktivität jeder Fraktion wurde gemessen.

3.10. ^{14}C Markierung SPP1 spezifischer Proteine

3.10.1 ^{14}C-Markierung von SPP1 Proteinen für die Dauer eines Phagenentwicklungszyklusses. Kulturen von B. subtilis 168 wurden in MIIM-Medium bei 30° gezogen. Nach Erreichen der Zelldichte von 2×10^{8} Zellen/ml wurden die Zellen abzentrifugiert und in gleichen Volumen frischem MIIM-Medium mit 5 µg pro AS/ml resuspendiert. Nach weiteren 15' Schütteln bei 30° wurden die Zellen mit SPP1, SPPR oder einer amber Mutante von SPP1 infiziert.

Die moi betrug in allen Experimenten zwischen 5 und 10. 0.1 ml der infizierten Kultur wurden 2' nach Infektion in ein Zentrifugenröhrchen (Servall) zu 7 µCi einer ^{14}C-markierten Aminosäure-Mischung (NEN, 1 mCi/ml) pipettiert und auf einem Schüttler bei 30° inkubiert. Unter diesen Bedingungen ist die Aufnahme von ^{14}C-markierten AS während der gesamten Phagenentwicklung annähernd linear. 45' nach Infektion wurde 1.0 ml NB-Medium hinzugegeben, die Probe weitere 3' bei 30° inkubiert und bis zur Aufarbeitung nach 3.10.2 in Eis gestellt.

3.10.2 Pulsmarkierung während der Phagenentwicklung. B. subtilis 168 wurde, wie unter 3.10.1 beschrieben, gezogen. Bei einer Zelldichte von 1 x 10^8 Zellen/ml wurden die Zellen abzentrifugiert und im gleichen Volumen MIIM-Medium resuspendiert und nach 15' weiterer Inkubation bei 30° mit Wildtyp oder einer amber Mutante infiziert. Zu verschiedenen Zeiten nach Infektion wurden der Kultur 0.1 ml entnommen und in Zentrifugenröhrchen zu 4 µCi ^{14}C-markierte Aminosäuren pipettiert. Nach 2' bzw. 3' wurde die Aufnahme radioaktiver Aminosäuren durch Verdünnung (10-fach) in NB Medium unterbrochen. Nach weiteren 3' Inkubation wurden die Zellen auf 0° abgekühlt.

3.11 Präparation der Proben für die Elektrophorese

Die Zellen der mit ^{14}C-Aminosäuren markierten Proben wurden durch Zentrifugation in einem Sorvall SS34 Rotor für 10' bei 12.000 upm

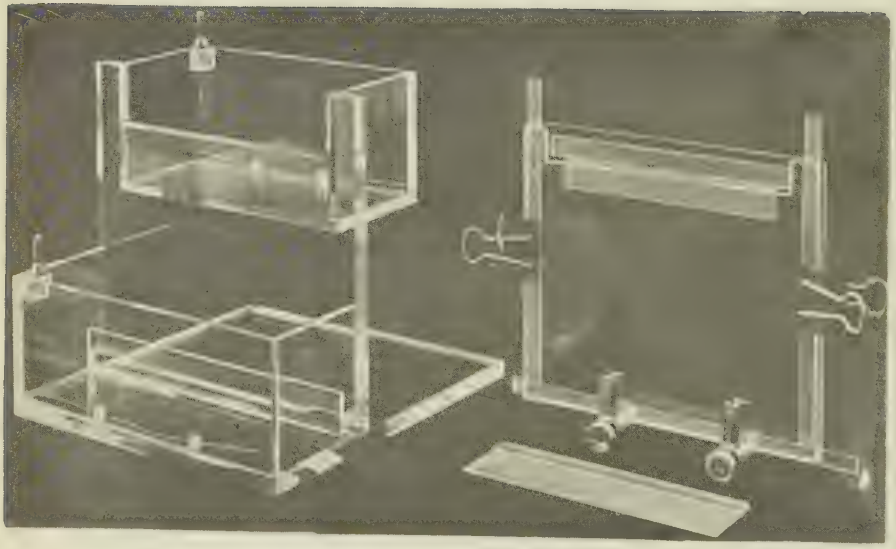

Abbildung 1: Platten-Gel-Apparat (Studier, F. W., J. Mol. Biol. (1973) 79, 237 - 248)

pelletiert und nach Absaugen des Überstandes (Wasserstrahlpumpe) in 50 µl E_1-Puffer (0.05 M Tris (HCl), pH 6.8, 1 % SDS, 1 % Mercaptoäthanol, 0.002 M EDTA, 10 % Glycerol) gelöst. Die Proben wurden dann für 3' in einem Wasserbad auf 100° erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die Probe geteilt und auf zwei Gele mit verschiedener Acrylamidkonzentration (10 %, 20 %) aufgetragen.

3.12 Elektrophorese

Die Proteine wurden im diskontinuierlichen Puffer-System von Laemmli (1970) und Studier (1969, 1973) durch 10, 20 und 25 % Platten-Acrylamid-Gelen analysiert.

Das Verhältnis Acrylamid : bis-Acrylamid betrug 30 : 0.8. Die Polymerisation wurde initiiert durch kleine Mengen TEMET und Ammoniumpersulfat. Das noch nicht polymerisierte Gel enthielt 0.19 M Tris (HCl), pH 8.8, 0,1 % SDS, 0.002 M EDTA und zwischen 10 und 25 % Acrylamid. Jedes Trenngel hatte ein Sammelgel, das 0.063 M Tris (HCl), pH 6,8, 0.1 % SDS, 0.002 M EDTA und 5 % Acrylamid enthielt. Der Elektrolytpuffer bestand aus 0.005 M Tris, 0,38 M Glycin, 0,1 % SDS und 0,002 M EDTA.

Eine 16-stündige Elektrophorese bei 35 V und einem 10 % Gel trennte Proteine mit einem MG von 25.000 Dalton und mehr auf. Ein 16-stündiger Lauf bei 80 V und einem 20 % Gel führte zu einer Auflösung der Proteine im Gel zwischen 4000 und 40.000 MG.

Die Apparatur der Platten-Gel-Elektrophorese ist ausführlich von Studier (1973) beschrieben worden und wird in Abb. 1 gezeigt.

Zur Bestimmung der Molekulargewichte der Hüllproteine relativ zu Referenzproteinen mit bekanntem Molekulargewicht wurden 10 cm lange Gele in Glasröhrchen von 12,5 cm Länge und 6 mm Durchmesser polymerisiert (Maizel, 1969). Eine Stromstärke von 2,5 mA pro Gel wurde für die Zeit von 8 bis 16 h, was von der Acrylamidkonzentration abhängig war, gegeben.

3.13 Auswertung der Gele nach Elektrophorese

3.13.1 Autoradiographie: Für die Autoradiographie wurden die Platten-Gele nach einer von Maizel (1971) beschriebenen Methode getrocknet. Für die Autoradiogramme wurden Kodak RB 54 und DuPont Filme benutzt. In der Regel wurden die Gele für 36 - 54 h auf die Filme gelegt.

3.13.2 Färben der Proteine: Die Proteine im Gel wurden mit Coomassie Brilliant Blue (Maizel, 1969) wie folgt gefärbt: Die Proteine wurden nach Elektrophorese zunächst durch eine 20-stündige Inkubation in einer 20 %igen Sulfosalizylsäurelösung im Gel fixiert und anschließend in einer wässrigen 25 %igen Coomassi Brilliant Blue-Lösung für ca. 4 h gefärbt. Danach wurde der nicht an Proteine gebundene Farbstoff aus dem Gel durch wiederholtes Waschen mit einer 7,0 %igen Essigsäurelösung entfernt.

3.14 Dissoziation des SPP1 Phagen in seine Strukturkomponenten Kopf und Schwanz durch Behandlung mit DMSO und EDTA

3.14.1 Behandlung mit DMSO. ^{14}C-SPP1 Phagen in TBT (1×10^{12} pfu/ml) wurden bei 4° mit 75 % (V/V) DMSO (Cummings et al, 1968; Mendez et al., 1971) inkubiert. Nach 35' wurde die DMSO Behandlung durch 10-fache Verdünnung mit TBT abgebrochen. Das DMSO wurde durch Dialyse gegen TBT bei 4° entfernt und die aus den Phagenköpfen entlassene DNA durch eine 30-minütige DNase-Behandlung (2 µg/ml) bei 37° abgebaut.

3.14.2 Behandlung mit EDTA. ^{14}C-SPP1-Phagen in TBT (1×10^{12} pfu/ml) wurden mit einer 0,1 M EDTA-Lösung 1 : 1 verdünnt und für etwa 17' bei 37° inkubiert. Das EDTA wurde anschließend durch Dialyse gegen TBT bei 4° entfernt und die DNA, wie unter 3.14.1 beschrieben, abgedaut.

3.15 Trennung der Phagenstrukturkomponenten (Kopf, Schwanz) durch Zentrifugation in einem Sucrosegradienten.

Ein Aliquot der DMSO- bzw. EDTA-behandelten ^{14}C-SPP1 Phagen wurde auf einen 15 - 30 %igen (W/V) Sucrosegradienten in TBT gegeben und in einem Beckman SW 50 L Rotor für 30' bei 27,500 upm und 4° zentrifugiert. Nach dem Zentrifugenlauf wurde der Gradient vom Boden her in ca. 35 Fraktionen ausgetropft. 20 µl jeder Fraktion wurden durch Radioaktivitätsmessungen im Scintillationszähler auf ^{14}C-markierte Proteine untersucht (Abb. 10). Die radioaktiv markierten Proteine von jedem Peak des Sucrosegradienten wurden nach Behandlung mit El-Puffer durch Disc Acrylamid-Gelelektrophorese analysiert und mit den Proteinen kompletter Phagen verglichen.

3.16 Elektronenmikroskopische Untersuchungen der durch den Sucrose-gradienten isolierten Phagenstrukturkomponenten.

Eine Suspension von Phagen oder Phagenstrukturkomponenten mit ca. 10^9 Partikeln/ml wurde auf Kohlenstoff-befilmte Objektträgernetze aufgetragen. Nach Absaugen überschüssiger Flüssigkeit wurde mit Uranylacetat negativ gefärbt oder mit Platin-Schrägbedampfung kontrastiert. Die jeweils verwendeten Vergrößerungen sind in der Legende angegeben.

3.17 Induktion und Nachweis der Glycerolphosphat-Dehydrogenase

3.17.1 Wachstum der Zellen und Induktion der GPD. *B. subtilis* 168 Zellen wachsen in 100 ml MIIM-Medium mit Glucose als Kohlenstoffquelle und 20 µg/ml AS bei 37°. Beim Erreichen einer Zelldichte von 2×10^8 Zellen/ml wurden die Zellen abzentrifugiert und in 100 ml frischem MIIM-Medium ohne Glucose resuspendiert. Zum Induzieren der GP-Dehydrogenase wurde Glycerin in einer finalen Konzentration von 20 mM hinzugegeben (Lindgren und Rutberg, 1973) und die Kultur eine weitere Stunde bei 37° inkubiert.

In Versuchen, bei denen die GP-Dehydrogenase nach Phageninfektion induziert wurde, wurden AS (100 µg/ml) als Kohlenstoffquelle im Wachstumsmedium verwendet. Das machte ein Abzentrifugieren und Waschen der Zellen nach Phageninfektion und vor Induktion der GP-Dehydrogenase durch Glycerol überflüssig.

3.17.2 Präparation des Enzymextraktes. Die Zellen wurden abfiltriert, bei 0° mit 100 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung gewaschen und in 2,0 ml 0,1 M tris-HCl-Puffer, pH 7,4, resuspendiert. Bei 0° wurden die Zellen mit einem 100 Watt Ultraschallgerät geöffnet, und diese Suspension wurde für 15' bei 17.000 x g zentrifugiert. Die Enzymaktivität der GP-Dehydrogenase wurde im Überstand gemessen.

3.17.3 Enzym-Nachweis. Die Aktivität der von NAD als Cofaktor unabhängigen GP-Dehydrogenase wurde durch Messung der Reduktionsrate des Farbstoffes MTT zu seinem Formazan gemessen, welches eine maximale Absorption bei 550 mμ hat (Lin et al., 1962).

Das Reaktionsgemisch enthielt folgende Komponenten: 2,0 ml 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,5; 0,1 ml 0,5 M L-α-Glycerolphosphat; 0,1 ml MTT (1 mg/ml); 0,3 ml DMS (1 mg/ml); 0,2 ml 0,1 M NaCN; 0,4 ml H_2O; zellfreier Enzymextrakt (20 - 100 µl). Die Reaktion wurde gemessen bei 25°.

3.18 In vitro Nachweis der RNA-Polymerase

3.18.1 Präparation der RNA-Polymerase (Rohextrakt)

B. subtilis 168 Zellen (infiziert oder nicht infiziert) wurden bei 37° in NB-Medium gezogen und bei Erreichen einer Zelldichte von 2×10^8 Zellen abzentrifugiert. Das Pellet wurde bei 0° in einer Lösung von 0.01 M

Tris (pH 8,0), 0,005 M EDTA und 25 % Sucrose resuspendiert. Der Suspension wurden 20 µl Lysozym (2 mg/ml) hinzugegeben, die Probe bei 0° für 10 min inkubiert und dann 0,12 ml 1 %ige Brij-H_2O Lösung zupipettiert. Nach Lyse der Zellen wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert und im Überstand die RNA-Polymeraseaktivität gemessen.

3.18.2 In vitro RNA-Polymerase Test

Zum Nachweis der RNA-Polymeraseaktivität im Rohextrakt wurde der Einbau von ^{3}H-UTP in TCA fällbares Material gemessen. In 0,05 ml Einbaupuffer (0,08 M Tris, pH 7,9; 0,02 M $MgCl_2$, 0,0002 M EDTA, 0,004 M DTT, 0,0 mg/ml BSA) wurden 0,03 ml H_2O und 10 µl RNA Polymerase enthaltender Rohextrakt hinzugegeben und diese Lösung für 3 bis 5 min bei 30° inkubiert. 0,01 ml einer 0,1 M Tris-Lösung mit allen Nukleotidtriphosphaten (ATP, CTP, UTP, GTP) und 30 mM PEP (final) wurden jetzt gleichzeitig mit 2 µl ^{3}H-UTP (250 µCi/ml) und 0.01 ml SPP1 DNA (50 µg/ml) der Testlösung hinzugegeben. Nach 10 und 20 min ^{3}H-UTP Einbau bei 37° wurden den Proben 0,4 ml H_2O (0°) und 0,5 ml 10 %ige TCA-Lösung (mit 0,05 M Pyrophosphat) zupipettiert und für weitere 15 min bei 0° inkubiert. Dann wurden die Proben auf Membranfilter (Millipore, 0,045 µ) gegeben, die Filter gewaschen und die Radioaktivität auf den Filtern im Szintillationszähler gemessen.

4. Experimente und Ergebnisse

Die vorliegenden Untersuchungen der Physiologie des SPP1 Phagen hatten zum Ziel, die nach Infektion von B. subtilis mit SPP1 auftretenden phageninduzierten Proteine zu identifizieren und zu charakterisieren. Weiterhin war es die Absicht, einen Einblick in die Regulation der Expression der SPP1 Gene zu erhalten.

Die dazu benutzte Methode besteht in der radioaktiven Markierung aller nach Infektion gebildeten Proteine und ihrer Analyse durch Elektrophorese in SDS-Acrylamidgelen. Eine eindeutige Bestimmung der phagenspezifischen Proteine nach dieser Methode wird jedoch dann sehr erschwert, wenn nach der Phageninfektion weiterhin Wirtsproteine gebildet werden. Da, wie sich in den ersten Versuchen zeigte, der SPP1 Phage die Synthese wirtsspezifischer Proteine nicht wesentlich hemmt, wurde in einer Reihe erster Experimente versucht, die Expression von Wirtsgenen selektiv zu inhibieren. Wie sich zeigte, war eine Hemmung der Wirtsproteinsynthese ohne gleichzeitigen Verlust der Synthese SPP1 spezifischer Proteine nicht möglich. Es mußte daher ein Weg gefunden werden, die Phagenproteine auch in Gegenwart der Wirtsproteine zu bestimmen. Dies wurde möglich durch die Verwendung von suppressor sensitiven Mutanten von SPP1, deren Proteinmuster im Gel mit dem des Wildtyps verglichen wurde. Zusätzlich konnte mit Hilfe dieser sus-Mutanten, die im weiteren Verlauf dieser Arbeit als amber-Mutanten bezeichnet werden, ein Teil der gefundenen phageninduzierten Proteine ihren Genorten auf der SPP1 DNA zugeordnet werden.

In einer weiteren Reihe von Experimenten wurde die Regulation der Genexpression untersucht. Dabei ging es vor allem um die Fragen, zu welcher Zeit nach Infektion die einzelnen SPP1 induzierten Proteine synthetisiert werden und ob aus ihrem zeitlichen Auftreten Schlüsse über ihre Regulation möglich sind. Drei Klassen von SPP1 Proteinen wurden gefunden. In einigen Versuchen zu ihrer Regulation wurde gezeigt, daß beim Fehlen der SPP1-DNA Replikation die späten Phagenproteine nicht gebildet werden.

In weiteren Experimenten wurde der Einfluß phageninduzierter Prozesse auf die Expression von wirtsspezifischen Funktionen untersucht.

4.1 Versuche zur selektiven Hemmung der Wirtsproteinsynthese

Die SPP1 induzierten Proteine wurden bestimmt, indem alle nach Infektion synthetisierten Peptide mit ^{14}C-Aminosäuren markiert und durch Elektrophorese in Acrylamidgelen aufgetrennt wurden. Erste Auftrennung markierter Proteine infizierter und nichtinfizierter Zellen im Gel (Abb. 2) zeigen, daß (1) in infizierten Zellen gegenüber uninfizierten zusätzliche Proteine auftraten, und (2) daß der größte Teil der Wirtsproteine nach Infektion weitersynthetisiert wird. Da in Gegenwart der Wirtsproteine eine eindeutige Bestimmung der Phagenproteine sehr erschwert wird, wurde zunächst versucht, durch UV-Bestrahlung des Wirtes vor Infektion (Hosoda und Levinthal, 1968; Studier und Maizel, 1969; Burgess und

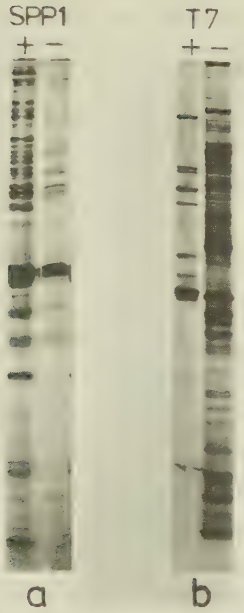

Abbildung 2: Proteinmuster uninfizierter und infizierter Zellen: (a) B. subtilis 168, SPP1, (b) E. coli B, T7

Denhardt, 1969; Gelfand und Hayashi, 1969) und b) durch Rifampicingabe zu einem bestimmten Zeitpunkt nach Infektion (Studier, 1969; Burgess et al., 1969) die Bildung von Wirtsproteinen zu hemmen.

4.1.1 UV-Bestrahlung des Wirtes nach Infektion.

B. subtilis 168 Zellen wurden ca. 30 Minuten vor Infektion verschieden lange mit UV Licht bestrahlt. Die Zahl der überlebenden Bakterien nach

dieser Behandlung wurde durch ihre Fähigkeit, Kolonien zu bilden, bestimmt (Abb. 3). Die nach Infektion mit SPP1 gebildeten Proteine UV-bestrahlter Zellen wurden radioaktiv markiert und nach Aufarbeitung

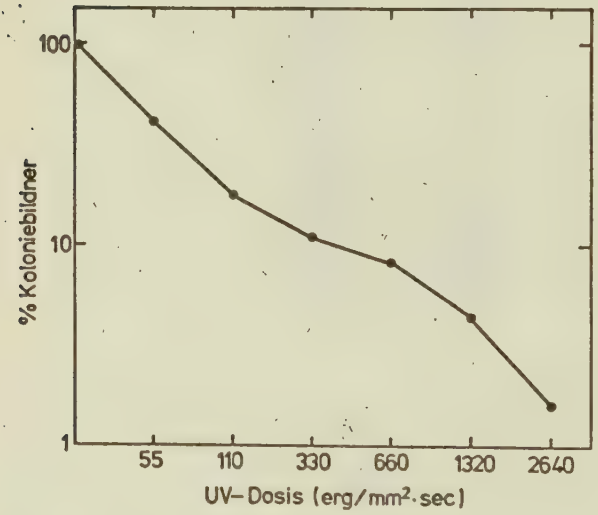

Abbildung 3: Inaktivierung von B. subtilis MCB (hcr⁻) durch Bestrahlung mit UV-Licht.

der Proben im Gel aufgetrennt. Die Verteilung der Proteine dieser Proben zeigt Abb. 4.

Die Inhibierung der Expression von Wirtsgenen führte zum gleichzeitigen Verlust der Synthese erkennbarer phagenspezifischer Proteine.

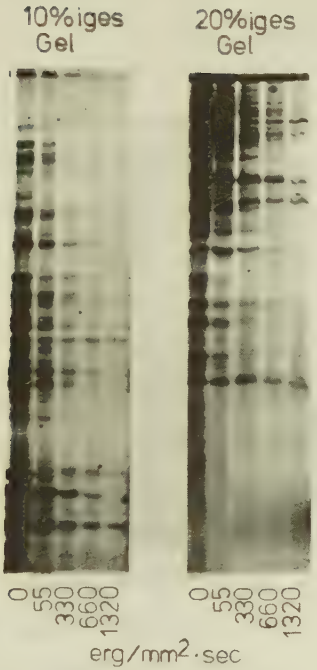

Abbildung 4: Proteinmuster infizierter B. subtilis MCB Zellen, die vor Infektion für verschiedene Zeiten mit UV-Licht bestrahlt wurden (10 %iges Gel).

Das heißt, eine selektive Hemmung der Expression nur der Wirtsgene war nicht möglich. Das deutet darauf hin, daß durch die UV-Bestrahlung der Zellen vor Infektion Wirtsgene geschädigt wurden, deren normale Expression sowohl für die Phagen- wie für die Bakterienentwicklung essentiell ist.

4.1.2 Versuche zu einer Hemmung der Wirtsproteinsynthese nach Expression früher Phagenproteine durch Rifampicin

Werden Bakterien mit einer normalerweise rifampicin-resistenten RNA-Polymerase mit Phagen infiziert, die für eine eigene rifampicin-resistente RNA-Polymerase kodieren, so ist es möglich, durch Rifampicin-Gabe zu einem Zeitpunkt, zu dem die rifampicin-resistente Phagen-polymerase bereits transkribiert ist, die Expression wirtsinduzierter Proteine zu inhibieren. Für den Fall, daß auch SPP1 für eine eigene rifampicin-resistente RNA-Polymerase kodiert, wäre es möglich, zumindest spät in der Phagenentwicklung durch Rifampicin die Synthese wirtsinduzierter Proteine zu unterbinden. 5 ml Zellkulturen von B. subtilis 168 mit rifampicin-sensitiver RNA-Polymerase wurden mit SPP1 infiziert und zu verschiedenen Zeiten nach Infektion wurde den Proben Rifampicin (150 µg/ml) zupipettiert. 90 Minuten nach Infektion wurden alle Kulturen lysiert und die Phagen der Lysate titriert. Das Ergebnis zeigt Abb. 5. Die Zahl der infektiösen Phagen der einzelnen Proben stieg mit der zeitlich späteren Rifampicingabe an. Wurde Rifampicin 30 Minuten nach Infektion gegeben, betrug der Phagentiter allerdings nur ca. 10 % von infizierten Kulturen ohne Rifampicin. Erwartet wurde für den Fall, daß SPP1 eine eigene rifampicin-resistente Polymerase besitzt, die Phagenentwicklung spät nach Infektion rifampicin unempfindlich wäre. Die wachsende Zahl der infektiösen Partikel in den Proben mit späterer Rifampicingabe entsprach dem in früheren Versuchen bestimmten Anstieg der Zahl intrazellulärer Phagen einer

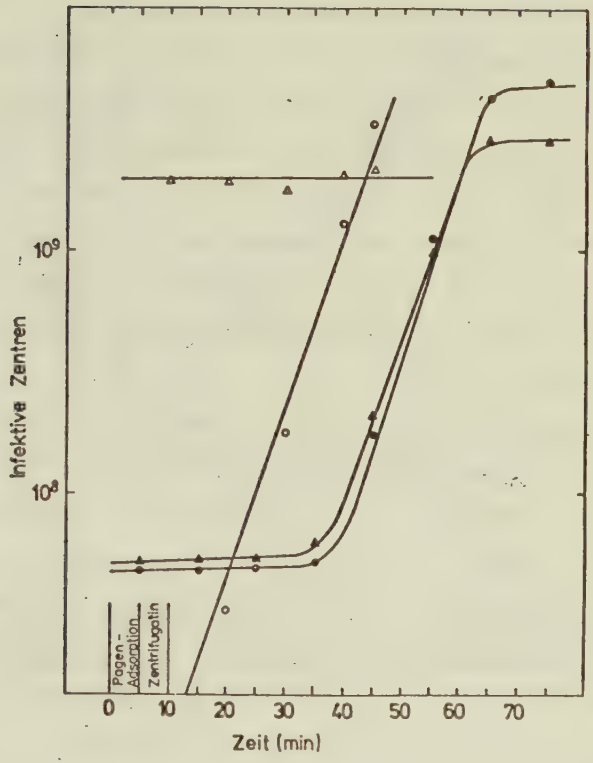

Abbildung 5: Wirkung von Rifampicin auf die Phagenbildung. Kulturen von B. subtilis 168 rifampicin-resistenten und B. subtilis 168 rifampicin-sensitiven Zellen (1×10^8 Zellen/ml) wurden mit einer moi von 10 infiziert und zu Proben dieser Kulturen zugegeben. Die Proben wurden bis 90' nach Infektion weiterinkubiert, mit Chloroform lysiert (0°) und die Phagen der Lysate titriert. o --- o 168 rifampicin-sensitiv, infiziert + Rifampicin; Δ --- Δ 168 rifampicin-resistent, infiziert + Rifampicin; ● --- ●, ▲ --- ▲ Einstufenkurve für beide Stämme.

nicht mit Rifampicin versetzten Kultur. D. h. es wurden in den Proben nur SPP1 Phagen nachgewiesen, die bereits zum Zeitpunkt der Rifampicin-

gabe vorhanden waren. Daraus folgt, daß Rifampicin auch spät nach Infektion die Transkription von SPP1 Genen inhibiert und nicht zur Diskriminierung der Wirtsgenexpression benutzt werden kann. Dieses Ergebnis läßt zwei Interpretationen zu: 1) zur Transkription des Phagengenoms wird die rifampicin-sensitive Wirts-RNA-Polymerase benutzt; 2) der SPP1 Phage kodiert für eine eigene rifampicin-sensitive RNA-Polymerase. Um zwischen diesen beiden Möglichkeiten unterscheiden zu können, wurde der oben beschriebene Versuch mit einer von mir isolierten rifampicin-resistenten B. subtilis 168 Mutante durchgeführt. Daß die Rifampicinresistenz dieses Stammes tatsächlich auf dem Niveau der RNA-Polymerase liegt und nicht durch eine Permeabilitätsschranke einer Zellwandmutante vorgetäuscht wird, wurde durch In-vitro Versuche bestätigt, in denen die RNA-Polymeraseaktivität im Rohextrakt dieser Zellen in Gegenwart und Abwesenheit von Rifampicin gemessen wurde (Abb. 6). Die Phagenentwicklung ist wie in Abb. 5 dargestellt wird, in dem rifampicin-resistenten Wirt in Gegenwart von Rifampicin normal. Hieraus kann geschlossen werden, daß der SPP1 Phage zur Transkription seines Genoms die Wirtspolymerase oder zumindest Teile der Wirtspolymerase (ß-Untereinheit) benutzt.

Die Versuche unter 4.1.1 und 4.1.2 zeigen, daß eine selektive Hemmung der Expression wirtsspezifischer Gene sowohl durch UV-Bestrahlung des Wirtes vor Infektion als auch durch Rifampicingabe zu bestimmten Zeiten nach Infektion nicht möglich ist ohne gleichzeitige Inhibierung der Expression phagenspezifischer Gene. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß die SPP1 Entwicklung weitgehend abhängig ist von der Funktions-

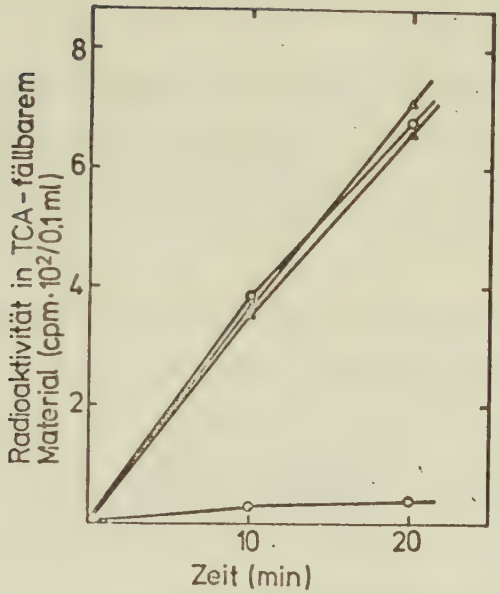

Abbildung 6: In-vitro Einbau von ^{3}H-Uridin in TCA fällbares RNA-Material. RNA-Polymerase (Rohextrakte) von rifampicin-sensitiven (o, ●) und rifampicin-resistenten (Δ, ▲) B. subtilis 168 Zellen wurde in Gegenwart (▲, ●) und Abwesenheit (Δ, o) von Rifampicin mit SPP1 DNA, wie in Material und Methoden beschrieben, inkubiert.

tüchtigkeit einer Reihe von Wirtsfunktionen auch nach Infektion. Damit wurde es unumgänglich, die Phagenproteine in Gegenwart von Wirtsproteinen zu identifizieren.

4.2 SPP1 spezifische Proteine

Die nach einer Phageninfektion von der Virus-DNA induzierten Proteine lassen sich in zwei Klassen einteilen:

1. Strukturproteine, aus denen die Proteinhülle infektiöser Partikel gebildet wird.
2. Funktionelle Proteine, die einmal zur Bildung der Virusbausteine (Nukleinsäuren, Hüllproteine) notwendig sind und zum anderen die Stoffwechselprozesse der Virussynthese wie den Stoffwechsel des Wirts kontrollieren.

Die Strukturproteine von SPP1 ließen sich relativ einfach durch die Analyse der Proteine gereinigter Phagenpartikel darstellen. Die funktionellen SPP1 Proteine jedoch mußten, wie oben erwähnt, in Gegenwart von Wirtsproteinen im Gel bestimmt werden. Hierzu dienten, wie später beschrieben, amber Mutanten von SPP1.

4.2.1 Strukturproteine infektiöser Phagenpartikel

Zur Bestimmung der Strukturproteine von SPP1 wurden über einem Cäsiumchloridgradienten gereinigte Phagenpartikel durch Erhitzen in einem Denaturierungspuffer (E1-Puffer) in ihre einzelnen Strukturproteine zerlegt. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine entweder mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue angefärbt, oder, wenn es sich um radioaktiv markierte Proteine handelte, durch ein Autoradiogramm im Gel identifiziert. Zehn verschiedene Strukturproteine wurden gefunden. Ihre Verteilung in einem 7,5 %igen Gel zeigt die Abb. 7.

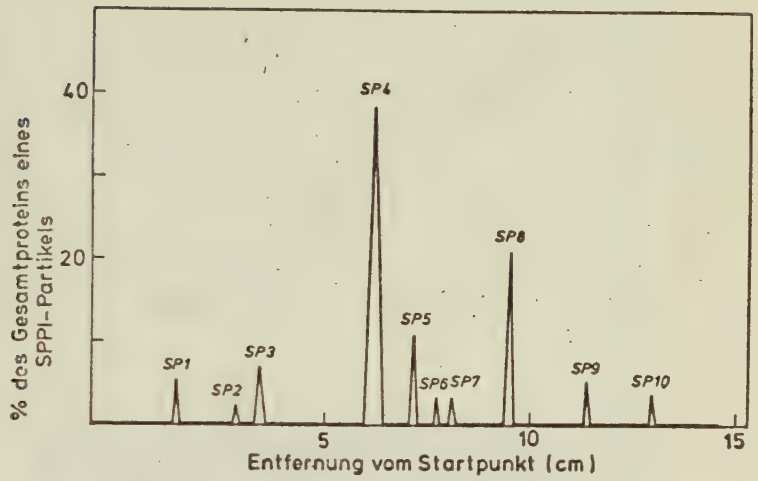

Abbildung 7: Verteilung der SPP1-Strukturproteine in einem 7,5 %igen Gel.

Die Molekulargewichte der Strukturproteine wurden durch den Vergleich ihrer Mobilität im Gel mit der von Proteinen mit bekanntem Molekulargewicht bestimmt. Werden die zurückgelegten Entfernungen der Eichproteine im Gel gegen den Logarithmus ihrer Molekulargewichte aufgetragen (Bishop et al., 1967; Leoning, 1969), so liegen sie auf einer Geraden (Abb. 8). Durch Interpolation ließen sich die Molekulargewichte der SPP1 Hüllproteine aus diesem Diagramm ermitteln (Tab. 1).

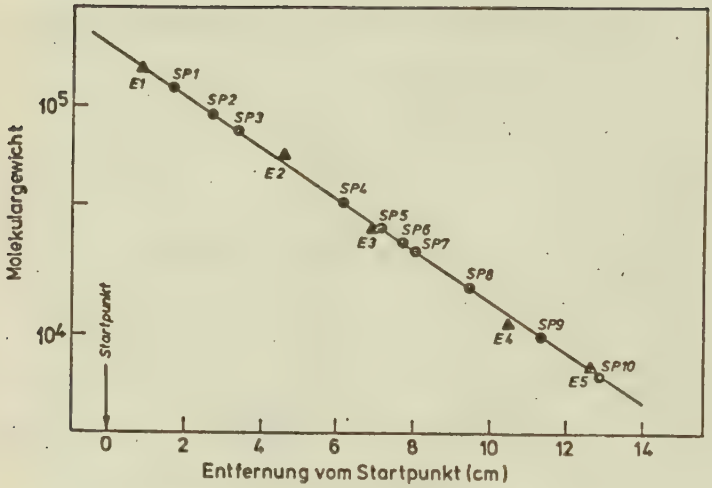

Abbildung 8: Molekulargewichte der Strukturproteine von SPP1. Die relativen elektrophoretischen Beweglichkeiten wurden der Abb. 7 entnommen. ● SPP1-Strukturproteine; ▲ Eichproteine (ß-Galactosidase-Untereinheit 130.000 MG, BSA 67.000 MG, Ovalbumin 45.000 MG, Chymotrypsinogen 25.000 MG, Cytochrom C 12.000 MG)

Tabelle 1: Strukturproteine des SPP1 Partikels.

Struktur-proteine	Molekulargewichte (Dalton)
SP1	120.000
SP2	95.000
SP3	81.000
SP4	49.500
SP5	43.000
SP6	38.500
SP7	36.000
SP8	28.000
SP9	19.500
SP10	11.000
	521.000

4.2.1.1 Proteine der Phagenkopf- und Phagenschwanz-Struktur

Die Möglichkeit, mit Dimethyl-Sulfoxid (DMSO) Phagenpartikel in ihre Strukturkomponente Kopf und Schwanz zu trennen (Cummings et al., 1968; Mendez et al., 1971), erlaubt es, zusätzlich zu bestimmen, welche der Hüllproteine die Kopf- und welche die Schwanzstruktur bilden. Eine 30 min Behandlung der SPP1 Partikel in einer 70 %igen DMSO-Lösung (V/V) führte zu einer weitgehenden Trennung der Strukturkomponente (Abb. 9). DMSO-Konzentrationen über 70 %

Abbildung 9: Trennung der Phagenköpfe und Phagenschwänze durch DMSO (30', 70 % DMSO). Vergrößerungen 45.000 x.

trennten die Phagenpartikel nicht nur in Köpfe und Schwänze, sondern lösten die Kopfstrukturen völlig auf. Die Phagenköpfe und -schwänze wurden nach der DMSO-Behandlung durch Zentrifugation in einem 15 - 30 %igen Sucrosegradienten isoliert (Abb. 10) und die Proteine dieser

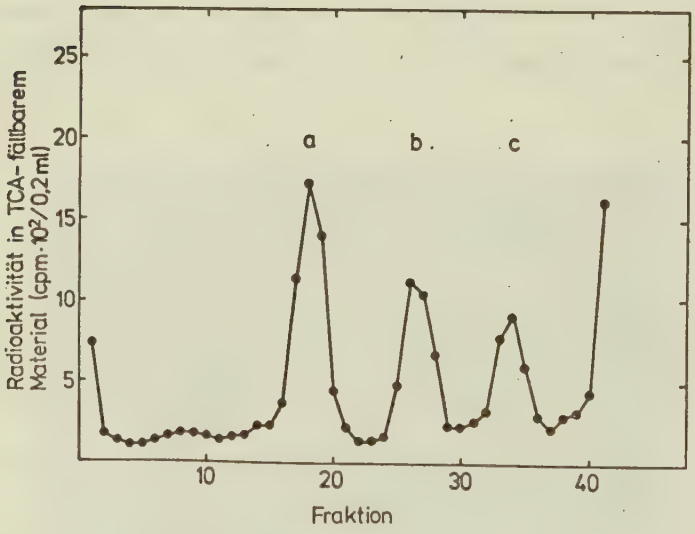

Abbildung 10: Trennung der Phagenstrukturkomponenten Kopf und Schwanz in einem 15 - 30 %igen Sucrosegradienten (36.000 upm, 100 min, 4°, SW50) (a) komplette Phagen, (b) Köpfe, (c) Schwänze.

Strukturkomponenten durch anschließende Elektrophorese bestimmt. Wie aus Abb. 11 hervorgeht, besteht der Phagenkopf aus vier verschiedenen Polypeptiden. Der Phagenschwanz mit Kragen wird aus sechs verschiedenen

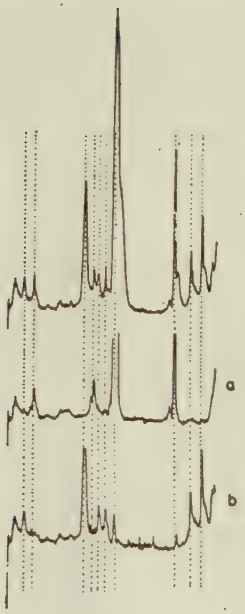

Abbildung 11: Proteine von Phagenköpfen (a), von Phagenschwänzen (b) und kompletten SPP1-Partikeln in einem 10 %igen Gel.

Polypeptiden gebildet. Ca. 40 % des Gesamtproteins eines Phagenpartikels wird durch das Hauptprotein des Kopfes SP4 dargestellt (Abb. 7).

4.2.2 Identifizierung SPP1 induzierter Proteine

Werden die Proteinmuster im Gel von SPP1 Wildtyp infizierten und uninfizierten Zellen verglichen, so werden im Falle der infizierten Zellen 23 zusätzliche Proteine identifiziert, unter ihnen die 10

Strukturproteine von SPP1 (Abb. 12). Daß es sich bei den nach Infektion auftretenden nichtstrukturellen Proteinen auch um phagenspezifische Proteine handelt, konnte durch den nachstehend beschriebenen Versuch erhärtet werden:

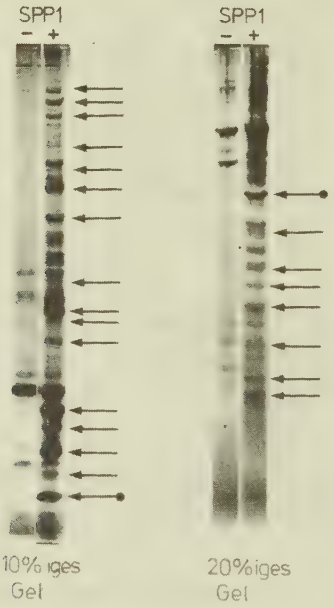

Abbildung 12: Proteinmuster infizierter und nichtinfizierter B. subtilis 168 Zellen in einem 10 und 20 %igen Gel.

4.2.2.1 Bestimmung SPP1 induzierter Proteine durch den Vergleich des Proteinmusters restringierender B. subtilis Zellen nach Infektion mit modifizierten, bzw. nichtmodifizierten Phagen.

Im Labor Trautner wurde aus einem B. subtilis Stamm ein Restriktionsenzym isoliert, das eine sehr häufig auf der DNA vorkommende Sequenz erkennt,

Abbildung 13: Proteinverteilung restringierender B. subtilis R Zellen nach Infektion mit SPP1·R (a) und SPP1·168 (b) in einem 10 und 20 %igen Gel; B. subtilis R uninfiziert (c). Die Linien kennzeichnen die Positionen SPP1-spezifischer Proteine.

an der es schneidet (-CCGG-). Dieser Befund ließ vermuten, daß nach Infektion des restringierenden Stammes (B. subtilis R) mit einem nichtmodifizierten Phagen (SPP1·168) als Folge der Restriktion keine normale Transkription und damit keine Synthese von SPP1 Proteinen möglich sind. Dieses Ergebnis wurde bestätigt. Im Falle der mit modifizierten Phagen infizierten Zellen wurden gegenüber denen mit nichtmodifizierten Phagen infizierten Zellen 23 zusätzliche Proteine gefunden (Abb. 13). Das Proteinmuster der mit nichtmodifizierten Phagen infizierten Zellen entsprach dem nichtinfizierter Zellen.

4.2.2.2 Identifikation SPP1 induzierter Proteine durch amber Mutanten

Um eindeutig in Gegenwart von Wirtsproteinen funktionelle Phagenproteine im Gel zu identifizieren, wurden die Proteinmuster von mit amber Mutanten von SPP1 infizierten Zellen mit dem Muster des Wildtyps verglichen. Wachsen amber Mutanten auf einem nicht permissiven Wirt, so werden statt der normalen Proteine der Gene, die die Mutanten tragen, nur Peptidfragmente gebildet. Da in der SDS-Acrylamid-Gel-Elektrophorese die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt wurden, fehlen die Proteine der Gene der jeweiligen Mutanten an den sonst üblichen Positionen im Gel.

In der Absicht, die Gesamtheit der SPP1 Cistren durch amber Mutanten zu charakterisieren, wurden über 300 amber Mutanten nach Mutagenese mit Hydroxylamin isoliert. 190 dieser Mutanten wurden näher charakterisiert. 38 dieser Mutanten zeigten auf MCB (Genotyp su^-) eine,

wenn auch geringe Wachstumsfähigkeit und wurden bei der weiteren Charakterisierung nicht berücksichtigt. Durch Komplementationstests wurden die restlichen 152 Mutanten in Gruppen mit identischen Funktionen klassifiziert (Tab. 2). 9 bereits vorhandenen Komplementationsgruppen (Behncke, 1973) wurden weitere 9 hinzugefügt.

Komplementationsgruppe	repräsentative amber Mutante	Anzahl der Mutanten in der Komplementationsgruppe
1	am 1o9	2
2	am 99	3
3	am 82	3
4	am 117	5
5	am 92	37
6	am 118	13
7	am 1o6	7
8	am 62	3
9	am 87	4
1o	am 2	1
11	am 7	1
12	am 12	1
13	am 22	13
14	am 31	7
15	am 46	19
16	am 70	10
17	am 86	23
18	am 9	2
		164

Tabelle 2 : Verteilung der amber Mutanten von SPP1 auf die Komplementationsgruppen.

Es standen somit amber Mutanten von 18 Cistren zur Bestimmung phageninduzierter Proteine zur Verfügung.

5,0 ml Zellkulturen (168, Genotyp su^-) wurden mit je einer für eines der 18 Cistren repräsentativen Mutante infiziert, und die Proteine nach 2 min Phagenadsorption in 0,15 ml Proben für die Dauer der Latenzperiode (45 Min) mit ^{14}C-Aminosäuren (30 µg/ml) radioaktiv markiert. Die Proteine der Proben wurden nach Aufarbeitung in 10 und 20 %igen Gelen aufgetrennt. Abb. 14 zeigt die Proteinverteilung je einer repräsentativen amber Mutante der bekannten 18 genetisch definierten Cistren. Den amber Mutanten von 13 Cistren fehlte je ein Protein. 5 dieser 13 Cistren kodieren, wie aus dem Vergleich mit der Auftrennung von Phagenhüllproteinen im gleichen Gel hervorgeht, für Strukturproteine.

3 weitere Mutanten zeigten einen pleiotropen Effekt. Ihnen fehlte mehr als ein Phagenprotein. Nach Infektion mit amber 109 konnten nur 3, nach Infektion mit amber 12 nur 4 phageninduzierte Proteine nachgewiesen werden. Der 3. pleiotropen Mutante, amber 7, fehlten 14 Proteine, darunter alle Strukturproteine. Durch die pleiotropen Mutanten wurden zusätzlich zu den oben genannten 13 amber Peptiden 5 weitere SPP1 Proteine charakterisiert. Das Proteinmuster von mit amber 109 infizierten Zellen glich bis auf 3 Phagenproteine dem uninfizierter Zellen und dem restringierender Zellen, die mit nichtmodifizierten Phagen infiziert waren.

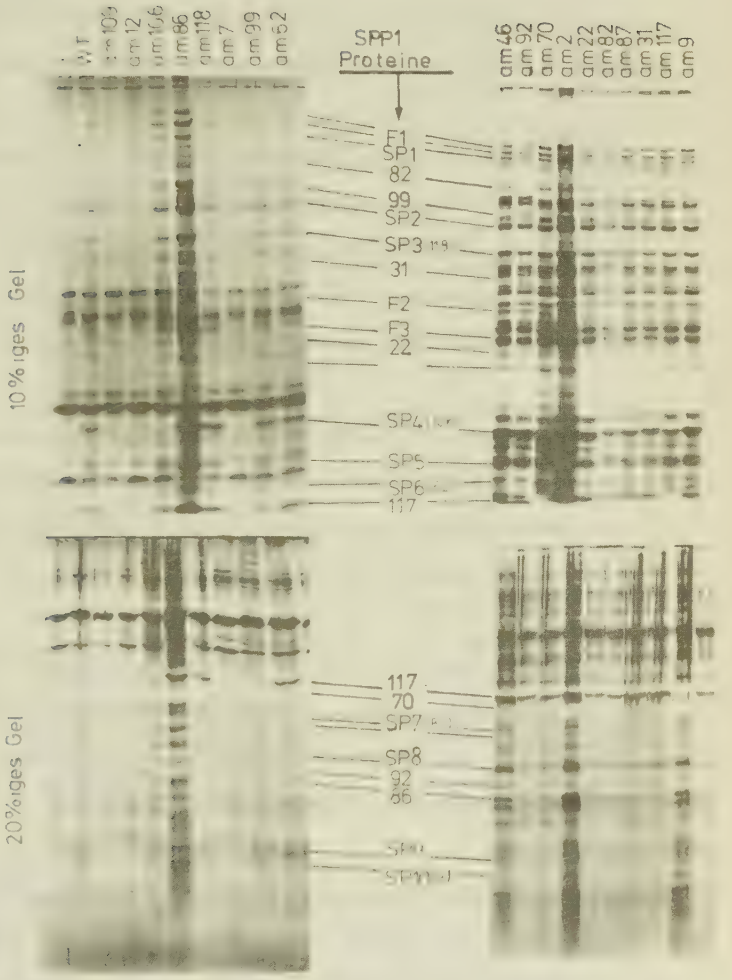

Abbildung 14: Proteinverteilung je einer repräsentativen amber-Mutante der 18 genetisch definierten Cistren in einem 10 und 20 %igen Gel. Die Proteine wurden für die Dauer einer Latenzperiode mit ^{14}C-markierten Aminosäuren (40 µCi/ml) markiert.

Mutanten von 2 der 18 Cistren, amber 2 und amber 46, zeigten das gleiche Proteinmuster im Gel wie der Wildtyp. Hierfür sind drei Erklärungen möglich, zwischen denen nicht unterschieden wurde:

a) Die Mutationen liegen in Transkriptionsrichtung so weit am Ende des Gens, daß die Mutantenproteine nur geringfügig kleiner sind als die Wildtypproteine. Ihre Laufgeschwindigkeit im Gel wird daher nicht merklich verändert. Sie erscheinen an gleicher Stelle wie die Wildtypproteine.

b) Es wäre möglich, daß, falls es sich hier um Proteine handelt, die nur mit sehr geringer Syntheserate gebildet werden, die hier benutzte Methode der Autoradiographie nicht empfindlich genug ist, um diese Proteine zu erfassen.

c) Die Proteine dieser Cistren befinden sich an gleichen Stellen im Gel wie die Wirtsproteine. Nach Infektion mit den amber Mutanten wird der Wegfall der phagen-induzierten Proteine unter den Wirtsproteinen nicht bemerkt.

Die Molekulargewichte von allen nach Infektion gefundenen SPP1 Proteinen sind in der Tabelle 3 angegeben. Ihre Summe beträgt ca. 1.170.000 Dalton. Um für diese Proteine zu kodieren, werden etwa 90 % der Informationskapazität der SPP1 DNA benötigt.

SPP1 Proteine	Molekulargewichte (Dalton)
F1	123.000
SP1	120.000
82	104.000
99	99.000
SP2	95.000
SP3	81.000
31	71.000
F2	60.000
F3	55.000
22	52.000
SP4	49.000
SP5	42.000
SP6	38.000
117	32.000
70	30.000
SP7	34.000
SP8	28.000
92	23.000
86	21.000
SP9	19.000
SP10	11.000
	1187.000

Tabelle 3: Molekulargewichte SPP1-spezifischer Proteine.

Die Ergebnisse der Experimente zur Bestimmung phageninduzierter Proteine lassen sich wie folgt zusammenfassen: 23 phageninduzierte Proteine wurden nach Infektion mit SPP1 gefunden:

a) 10 dieser Proteine wurden durch die Analyse gereinigter Phagenpartikel als Strukturproteine identifiziert. Zusätzlich wurde bestimmt, daß 4 Proteine die Kopfstruktur und 6 Proteine die Schwanz- und Kragenstruktur bilden.

b) Weitere 8 funktionelle Proteine konnten durch amber Mutanten von SPP1 charakterisiert werden.

c) 3 amber Mutanten zeigten einen pleiotropen Effekt. Nach Infektion mit diesen Mutanten fehlten mehr als ein Phagenprotein.

d) 5 nach Infektion auftretende Proteine konnten nicht eindeutig als phagenspezifisch charakterisiert werden, da in den für sie kodierenden Cistren keine amber Mutanten vorlagen.

4.3 Untersuchungen über die Regulation SPP1 induzierter Proteine nach Infektion.

Nachdem in den vorhergehenden Versuchen die SPP1 induzierten Proteine identifiziert und charakterisiert wurden, soll in diesem Abschnitt untersucht werden, zu welchem Zeitpunkt diese Proteine nach Infektion gebildet werden und wie ihre Synthese reguliert ist.

4.3.1 Bestimmung des zeitlichen Verlaufs der Synthese SPP1 spezifischer Proteine.

Der zeitliche Verlauf der Synthese SPP1 induzierter Proteine nach Infektion wurde durch die Elektrophorese von Extrakten bestimmt, die zu verschiedenen Zeiten nach Infektion für 3 min mit ^{14}C-Aminosäuren radio-aktiv pulsmarkiert wurden. Auf dem Autoradiogramm erscheinen nur die Proteine, die während der Pulszeit synthetisiert wurden. Um das Erscheinen der Proteine so genau wie möglich zu bestimmen, d. h. die Phagenentwicklung aller Zellen weitgehend zu synchronisieren, wurde mit einer Phagenmultiplizität von 20 infiziert und die Infektion schon nach 2 min mit SPP1 Antiserum gestoppt. Die graphische Auswertung der Proteinmuster einer Reihe von 3-Minuten-Pulsen in einem 10 und 20 %igen Gel wird in Abb. 15 gezeigt. Drei SPP1 Proteine erscheinen früh, ca. 5 bis 7 Minuten nach Infektion. Zwei dieser Proteine werden nur für ca. 15 min gebildet, während das dritte bis zum Eintritt der Lyse nachgewiesen werden kann.

Ca. 15 bis 20 Minuten nach Infektion beginnt die Synthese einer zweiten Gruppe von 14 Phagenproteinen, die bis zur Lyse andauert. Zu diesen Proteinen zählen die 10 Strukturproteine.

Vier Proteine zählen zu einer dritten Gruppe phageninduzierter Proteine, die erst ca. 25 min nach Infektion auftritt und ebenfalls bis zur Lyse gebildet wird.

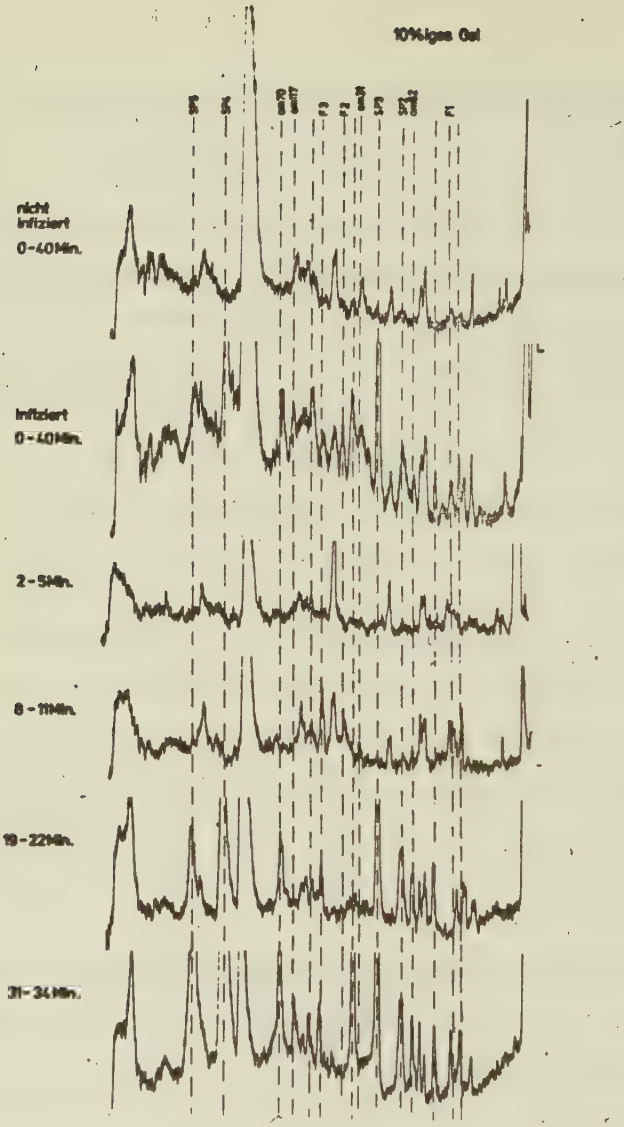

Abbildung 15a: Zeitlicher Verlauf der Synthese SPP1-spezifischer Proteine nach Infektion von B. subtilis 168 (10 %iges Gel). Die gezeigten Proben wurden zu den angegebenen Zeiten für 3 min mit ^{14}C markierten Aminosäuren markiert. Als Kontrolle wird das Proteinmuster von dauermarkierten, infizierten und nichtinfizierten Zellen gezeigt.

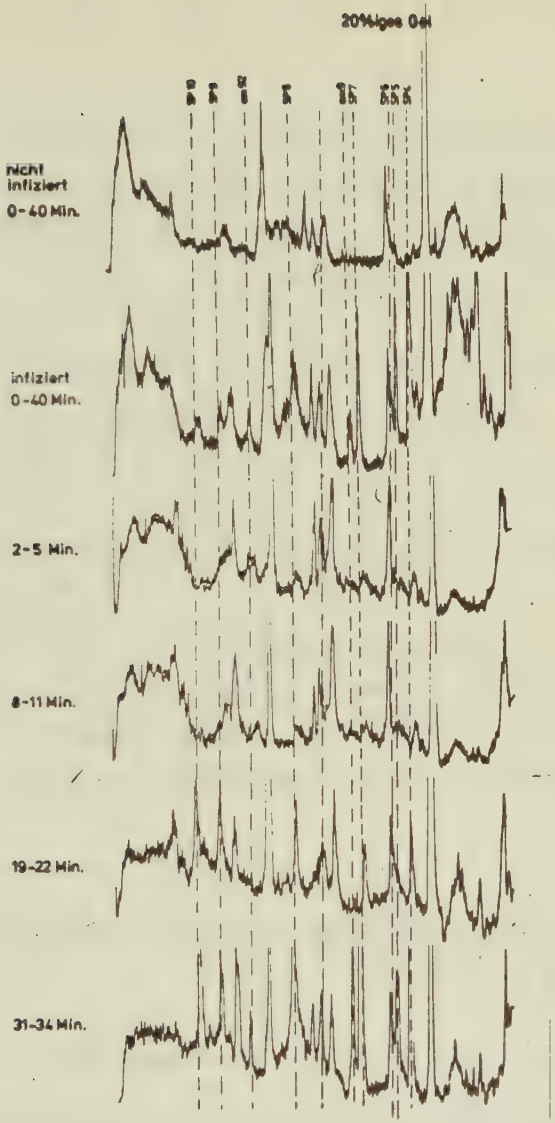

Abbildung 15b: Zeitlicher Verlauf der Synthese SPP1-spezifischer Proteine nach Infektion von B. subtilis 168 (20 %iges Gel). Die gezeigten Proben wurden zu den angegebenen Zeiten für 3 min mit ^{14}C markierten Aminosäuren markiert. Als Kontrolle wird das Proteinmuster von dauermarkierten, infizierten und nichtinfizierten Zellen gezeigt.

für die Expression später Phagengene notwendig ist. Es wurde daher als erstes untersucht, ob die Mutante amber 109 in der Lage ist, ihre DNA zu replizieren.

4.3.2.1 Untersuchungen zur phagenspezifischen DNA Replikation nach Infektion mit amber 109.

B. subtilis 168-3, Thymin$^-$ Zellen, wurden in Gegenwart von ^{3}H(Methyl) Thymidin mit der Mutante amber 109 und zur Kontrolle mit amber 87 (Mutante in einem Strukturprotein) und mit SPP1 Wildtyp infiziert.

7 min und 20 min nach Infektion wurden den Kulturen Proben entnommen und die Zellen dieser Proben, wie unter 3.9 .2 beschrieben, lysiert. Die ^{3}H-DNA der Lysate wurde anschließend in einem 5 bis 20 %igen Sucrosegradienten charakterisiert (Abb. 17). Die Analyse der Gradienten der mit amber 109 infizierten Proben zeigt keinen nennenswerten Anstieg der Radioaktivität 20 min nach Infektion gegenüber 5 min in einem Bereich, in dem hinzugegebene native ^{14}C-markierte Referenz-DNA bandet. Die Ergebnisse der Kontrollversuche mit amber 87 und SPP1 Wildtyp sind ebenfalls aus Abb. 17 zu ersehen. In beiden Fällen nimmt die Radioaktivität im Bereich nativer SPP1 DNA und im Bereich der Bodenfraktionen in den Proben 20 min nach Infektion stark zu. Die Zunahme der Radioaktivität in den Bodenfraktionen ist vor allem auf multimere Formen der replizierenden SPP1 DNA zurückzuführen (Kahmann, 1973; Schlaeger, 1973).

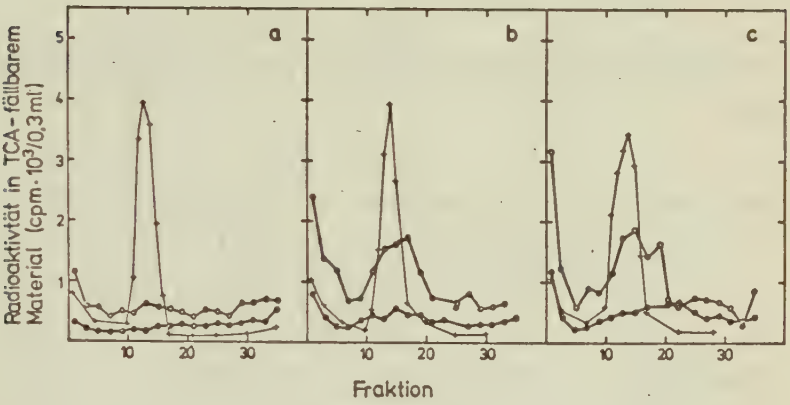

Abbildung 17: Sedimentation von ^{3}H-Thymidin-markierter SPP1 DNA aus Proben 7 min (• --- •) und 20 min (o --- o) nach Infektion mit (a) amber 109, (b) amber 87, (c) SPP1 Wildtyp. Native ^{14}C-Thymidin-markierte SPP1 DNA diente als Sedimentationsstandard (x --- x).

Diese Versuche bestätigen, daß die Mutante amber 109 nach Infektion nicht in der Lage ist, ihre DNA zu replizieren. Es gibt folgende Möglichkeiten, diesen Befund zu erklären: Das Genprodukt von amber 109 wird direkt für die DNA-Replikation benötigt. Ist die Transkription später Proteine von der Replikation abhängig, so ist auch das Fehlen dieser Proteine nach Infektion mit amber 109 erklärbar. Eine weitere Möglichkeit wäre die Annahme, daß das Produkt des Gens 109 ein Kontrollelement der Transkription später Proteine ist, und eines dieser späten Proteine für die Replikation benötigt wird.

Im folgenden Experiment wird versucht, den Zusammenhang zwischen der DNA Replikation und der Expression später Phagenproteine zu verifizieren.

.3.2.2 Hemmung der Expression später SPP1 Proteine durch Hydroxyphenylazo-Urazil.

Hydroxyphenylazo-Urazil (HPUra) hemmt spezifisch die semikonservative Replikation der B. subtilis DNA und hat keinen sichtbaren Effekt auf die Bildung anderer zellulärer Makromoleküle (RNA, Proteine) (Brown, 1970; Brown, 1971; Brown et al., 1972). Während die Replikation einer Reihe von virulenten B. subtilis Phagen, wie z. B. SP3, SP02 C, SP8 (Brown, 1970), PBS 2 (Price and Fogt, 1973), ϕe (Marcus and Newlon, 1971), SP01 (Yehle and Ganesan, 1972) und ϕ29 (Schachtele et al., 1973), durch HPUra nicht beeinflußt wird, hemmt das Azopurin die Replikation von SPP1. Wie die Abb. 18 zeigt, konnte in SPP1 infizierten wie nichtinfizierten Zellen in Gegenwart von 70 µg/ml HPUra kein Einbau von ^{3}H-Methylthymidin in TCA fällbares DNA Material nachgewiesen werden. Diese Tatsache weist wieder auf die starke Abhängigkeit der Phagenentwicklung von Wirtsfunktionen hin. Der Einbau von ^{14}C-markierten Aminosäuren in Proteine wird dagegen nicht beeinflußt (Abb. 19). Auch ist es möglich, in Gegenwart von HPUra induzierbare Wirtsenzyme, z. B. die Glycerolphosphatdehydrogenase, zu induzieren (Daten nicht gezeigt).

Die Auftrennung von nach Infektion mit SPP1 in Gegenwart von HPUra markierten Proteinen (Abb. 20) zeigt, daß nur die frühen Proteine erscheinen. Das Proteinmuster entspricht dem von amber 109.

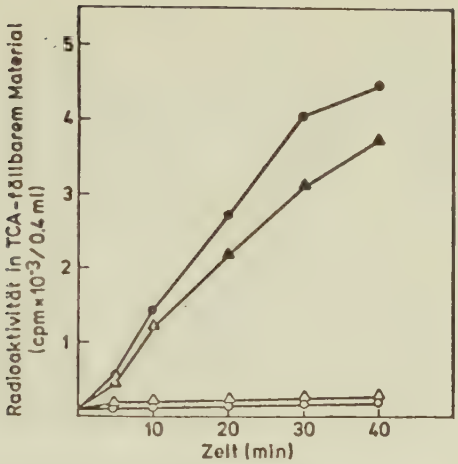

Abbildung 18: Einbau von ^{3}H(Methyl)Thymidin in TCA-fällbares DNA-Material von nicht infizierten (Δ --- Δ) und infizierten (o --- o) *B. subtilis* 168-3 thy^{-} Zellen in Gegenwart von HPUra (70 µg/ml) Kontrollen ohne HPUra (● ---●) infiziert; (▲ --- ▲)nicht infiziert.

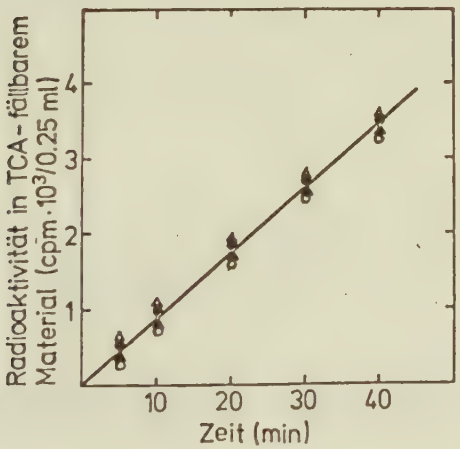

Abbildung 19: Wirkung von HPUra auf den Einbau ^{14}C-markierter Aminosäuren in Proteine infizierter (o --- o) und nicht infizierter (Δ --- Δ) *B. subtilis* 168 Zellen. Kontrollen (● --- ●) infiziert; (▲ --- ▲) nicht infiziert, ohne HPUra.

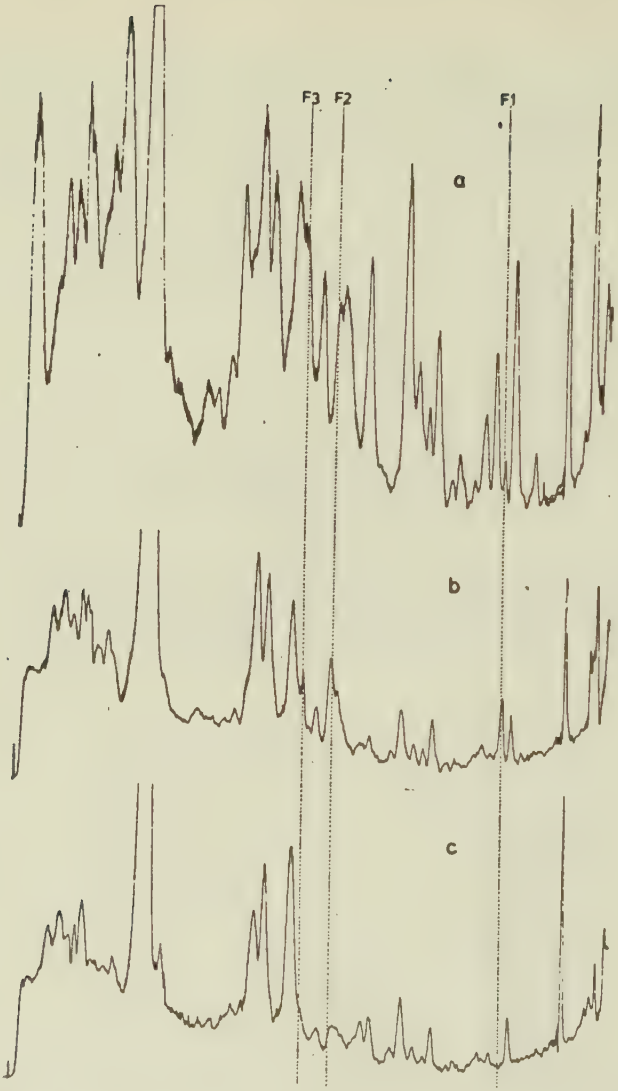

Abbildung 20: Synthese SPP1-spezifischer Proteine nach Infektion von B. subtilis 168 in Gegenwart von HPUra; infiziert (b), nicht infiziert (c) infiziert ohne HPUra (a). F1, F2, F3 sind die frühen SPP1-Proteine.

Die frühen Proteine werden in einer etwas geringeren Menge gebildet, was z. B. dadurch erklärt werden kann, daß durch die Inhibierung der DNA Synthese durch HPUra nicht genügend Kopien der SPP1 DNA zur Transkription dieser Proteine vorliegen.

Um auszuschließen, daß das Fehlen der späten Proteine nach Hemmung der SPP1 Replikation durch HPUra in einem direkten Zusammenhang steht mit der Anzahl der den Zellen zur Transkription zur Verfügung stehenden Genome (Gendosiseffekt), wurde in einem weiteren Versuch mit einer Phagenmultiplizität von 30 infektiösen Partikeln/Zelle infiziert. Obwohl gegenüber einer normalen Infektion dadurch eine etwa um das 10-fache höhere Anzahl von DNA Molekülen in den Zellen vorlag, wurden keine späten SPP1 Proteine im Gel gefunden. Die drei frühen Proteine waren dagegen auf den Autoradiogrammen stärker ausgeprägt, was dafür spricht, daß im Falle eines Gendosiseffektes für die späten Proteine, letztere wenigstens schwach hätten erscheinen müssen.

Die oben beschriebenen Versuche bestätigen die Hypothese, daß die Expression später SPP1 Gene gekoppelt ist mit der Replikation der Phagen DNA.

Die experimentellen Daten, die sowohl über die Kinetik der Synthese von SPP1 Proteinen wie über die Regulation der Genexpression gefunden wurden, lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Die SPP1 induzierten Proteine lassen sich nach ihrem zeitlichen Erscheinen wie folgt unterscheiden:

(a) in Proteine (drei), die ca. 5 min nach Infektion erscheinen. Zwei dieser Proteine werden nur für ca. 15 min gebildet, während das dritte bis zum Zeitpunkt der Lyse nachgewiesen werden konnte.

(b) in Proteine (vierzehn), deren Synthese 15 - 17 min nach Infektion beginnt. Zu dieser Gruppe gehören alle Phagenstrukturproteine (10).

(c) in Proteine, die von 25 min nach Infektion bis zur Lyse gebildet werden (vier).

2. Nach Infektion mit amber 109 treten nur frühe Proteine auf.

3. Die Expression später Phagenproteine ist abhängig von einer normalen Phagen DNA Replikation. Hierfür spricht:

(a) Die Inhibierung der DNA Replikation nach Infektion mit Wildtyp durch HPUra hemmt selektiv die Expression später Phagenproteine.

(b) Die SPP1 Mutante amber 109, der alle späten Proteine fehlen, zeigt keine DNA Replikation.

4.4 Untersuchungen zur Regulation wirtsinduzierter Proteine nach Phageninfektion.

Aus den Versuchen, die Expression wirtsspezifischer Gene nach Infektion mit SPP1 selektiv zu hemmen, und aus Experimenten zur Regulation phageninduzierter Proteine ging hervor, daß der SPP1 Phage einen großen Teil der Wirtsfunktionen nicht inhibiert. Die Phagenentwicklung ist an eine Reihe von Wirtsfunktionen gebunden. In den folgenden Untersuchungen sollte analysiert werden, inwieweit der Phage nach Infektion die Synthese wirtsspezifischer Proteine beeinflußt.

4.4.1 Zeitlicher Verlauf der Synthese wirtsinduzierter Proteine nach SPP1 Infektion.

Die Synthese von Wirtsproteinen nach Infektion wurde wie die von Phagenproteinen durch Pulsmarkierungsexperimente charakterisiert. Aus den in Abb. 21 gezeigten 10 und 20 %igen Gelen geht hervor, daß sich die B. subtilis Proteine nach dem zeitlichen Verlauf ihrer Synthese nach Infektion in drei Gruppen einteilen lassen:

1. Zur Gruppe 1 zählen Proteine, deren Synthese schon ca. 5 min bis 10 min nach Infektion aufhört (WP2, WP IV).

2. Proteine einer zweiten Gruppe werden bis ca. 25 min nach Infektion gebildet (WP I, WP V, WP VII). Ihre Synthese stoppt zu einer Zeit,

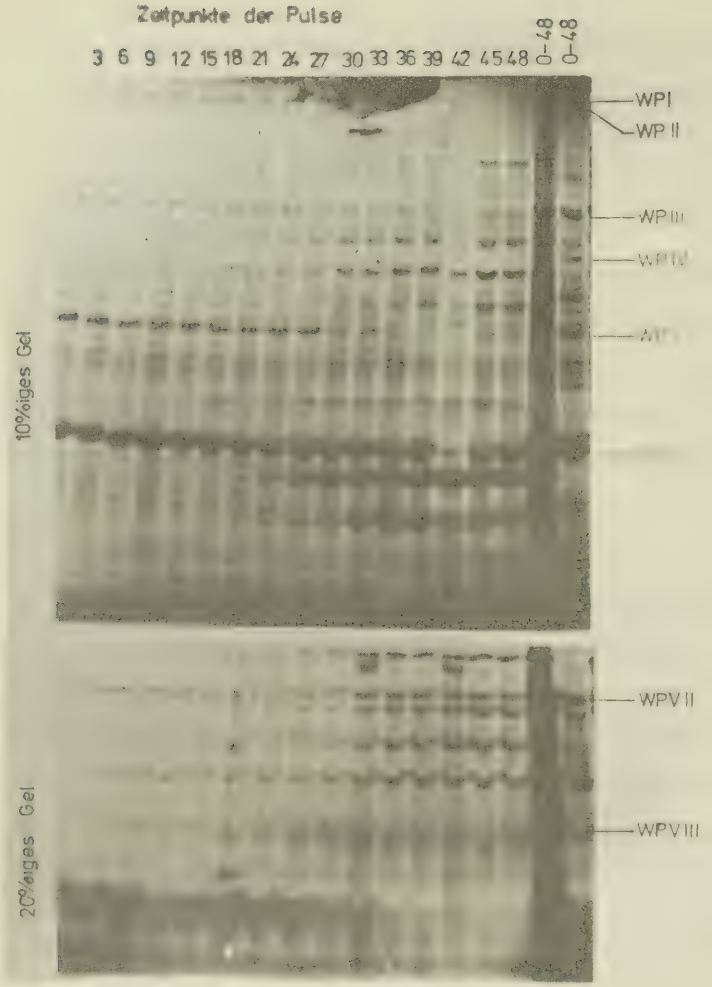

Abbildung 21: Zeitlicher Verlauf der Synthese wirtsspezifischer Proteine nach Infektion. Die Proteine WPII und WPIV werden bei ca. 10 min die Proteine WPI, WPV und WPVIII bis ca. 17 min nach Infektion und der Proteine WPIII, WPVI und WPVIII bis zur Lyse der Zellen gebildet.

in der die Klasse 3 der späten Phagenproteine erscheint. Nach Infektion mit der pleiotropen amber Mutante 109 wird diese Gruppe wirtsspezifischer Proteine nicht inhibiert, d. h. bis zur Lyse weitergebildet.

3. Eine dritte Gruppe von Wirtsproteinen wird in gleicher Rate wie in uninfizierten Zellen während des ganzen Phagenentwicklungszyklusses gebildet (WPIII, WPVI, WPVIII).

Diese Ergebnisse erforderten den Nachweis, daß nach Infektion Wirtsproteine induziert werden können.

4.4.2 Nachweis der Induktion der Glycerolphosphatdehydrogenase nach SPP1 Infektion.

Die Glycerolphosphatdehydrogenase ist ein Enzym, das sich durch Wechsel der Kohlenstoffquelle im Medium leicht induzieren und in einem einfachen Enzymtest nachweisen läßt. Zur Phagenentwicklung wird es in keiner Weise benötigt. Im folgenden Experiment wurde untersucht, inwieweit die Glycerolphosphatdehydrogenase nach SPP1 Infektion noch induziert werden kann.

B. subtilis 168 Zellen wurden in Minimalmedium mit 100 µg Aminosäuren/ml als Kohlenstoffquelle gezogen. Beim Erreichen einer Zelldichte von 2×10^8 Zellen/ml wurde ein Teil der Kultur mit SPP1

infiziert. In der nichtinfizierten Kultur sowie 7 min, 15 min. bzw. 20 min nach Infektion in der infizierten Kultur wurde die Glycerolphosphatdehydrogenase durch Zupipettieren von Glycerin induziert. 10 min nach Induktion wurde die Enzymaktivität der Glycerolphosphatdehydrogenase im Rohextrakt gemessen. Die Ergebnisse zeigt die Abb. 22. Die Glycerolphosphatdehydrogenase

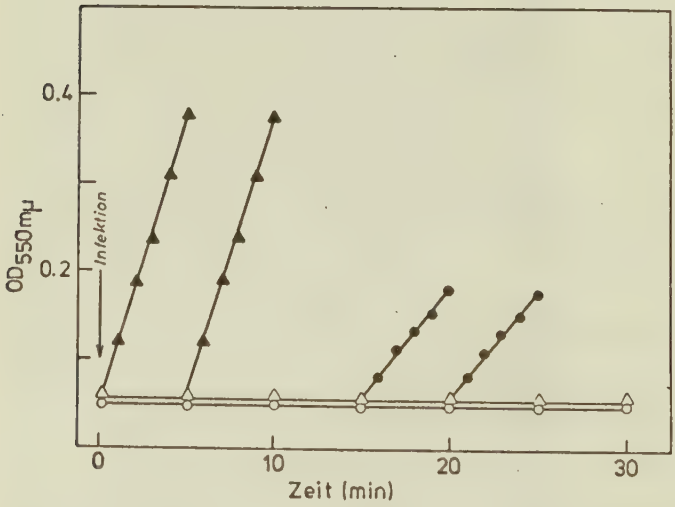

Abbildung 22: Nachweis der Glycerolphosphat-Dehydrogenase nach Induktion. Die Wirkung des induzierten Enzymes ist in Abhängigkeit von der Zeit aufgetraten.

kann 20 min nach Infektion noch induziert werden. Die Syntheserate des Enzyms in 5 min nach Infektion infizierten Zellen war gleich der von induzierten, nichtinfizierten Zellen, während die

Syntheserate von 15 bis 20 min nach Infektion induzierter Zellen nur noch ca. 40 % der von nichtinfizierten induzierten Zellen betrug. Die Abnahme der Syntheserate spät in der Phagenentwicklung könnte durch die Belastung des Wirtssyntheseapparates durch die Phagenentwicklung erklärt werden.

Dieses Ergebnis wird dahingehend interpretiert, daß z. B. im Gegensatz zu den T-Phagen, die sehr früh nach Infektion alle Wirtsfunktionen abstellen, der SPP1 Phage auch die Expression von Wirtsfunktionen nicht inhibiert, die er zu seiner Entwicklung nicht benötigt.

5. Diskussion

Mit den in dieser Arbeit vorliegenden Untersuchungen über die Expression SPP1 spezifischer Gene nach Infektion von B. subtilis wurden zwei Ziele verfolgt:

a) Es sollten möglichst alle Genendprodukte (Proteine), für die der Phage kodiert, erfaßt werden.

b) Die Charakterisierung der Synthese der einzelnen Phagenproteine sollte einen Einblick in die Regulation der SPP1 Genexpression geben.

Das Prinzip der Versuche war, die nach Infektion gebildeten phagenspezifischen Proteine in Dauermarkierungen oder in Pulsen zu verschiedenen Zeiten nach Infektion radioaktiv zu markieren und sie mittels gelelektrophoretischer Methoden und Autoradiographie zu charakterisieren.

5.1 SPP1 spezifische Proteine

23 SPP1 spezifische Proteine wurden nach Infektion von B. subtilis 168 identifiziert und charakterisiert. 1o dieser phageninduzierten Proteine sind Hüllproteine. 4 von ihnen bilden die Kopf-, 6 die Phagenschwanzstruktur. Das Gesamtmolekulargewicht der Strukturproteine (je eine Kopie) beträgt ca. 521.ooo Dalton. Um für diese Proteine zu kodieren, werden etwa 42 % der Informationskapazität der SPP1 DNA benötigt. Von 13 weiteren funktionellen Proteinen, die nach Infektion auftraten, wurden 8 durch amber Mutanten

Syntheserate von 15 bis 20 min nach Infektion induzierter Zellen nur noch ca. 40 % der von nichtinfizierten induzierten Zellen betrug. Die Abnahme der Syntheserate spät in der Phagenentwicklung könnte durch die Belastung des Wirtssyntheseapparates durch die Phagenentwicklung erklärt werden.

Dieses Ergebnis wird dahingehend interpretiert, daß z. B. im Gegensatz zu den T-Phagen, die sehr früh nach Infektion alle Wirtsfunktionen abstellen, der SPP1 Phage auch die Expression von Wirtsfunktionen nicht inhibiert, die er zu seiner Entwicklung nicht benötigt.

5. Diskussion

Mit den in dieser Arbeit vorliegenden Untersuchungen über die Expression SPP1 spezifischer Gene nach Infektion von B. subtilis wurden zwei Ziele verfolgt:

a) Es sollten möglichst alle Genendprodukte (Proteine), für die der Phage kodiert, erfaßt werden.

b) Die Charakterisierung der Synthese der einzelnen Phagenproteine sollte einen Einblick in die Regulation der SPP1 Genexpression geben.

Das Prinzip der Versuche war, die nach Infektion gebildeten phagenspezifischen Proteine in Dauermarkierungen oder in Pulsen zu verschiedenen Zeiten nach Infektion radioaktiv zu markieren und sie mittels gelelektrophoretischer Methoden und Autoradiographie zu charakterisieren.

5.1 SPP1 spezifische Proteine

23 SPP1 spezifische Proteine wurden nach Infektion von B. subtilis 168 identifiziert und charakterisiert. 1o dieser phageninduzierten Proteine sind Hüllproteine. 4 von ihnen bilden die Kopf-, 6 die Phagenschwanzstruktur. Das Gesamtmolekulargewicht der Strukturproteine (je eine Kopie) beträgt ca. 521.ooo Dalton. Um für diese Proteine zu kodieren, werden etwa 42 % der Informationskapazität der SPP1 DNA benötigt. Von 13 weiteren funktionellen Proteinen, die nach Infektion auftraten, wurden 8 durch amber Mutanten

von SPP1 und 5 sowohl durch die pleiotrope Mutante amber 109 als auch durch den Vergleich von Zellextrakten restringierender Zellen (B. subtilis-R), die mit modifizierten (SPP1·R) und nicht-modifizierten (SPP1·168) Phagen infiziert worden waren, als SPP1 spezifisch charakterisiert. Das Molekulargewicht aller nach Infektion gefundenen Phagenproteine beträgt ca. 1.170.000 Dalton und entspricht etwa 90 % der Informationskapazität der DNA. Das bedeutet, daß die Anzahl der SPP1 Gene weitgehend erfaßt wurde.

Die restlichen ca. 10 % der SPP1 DNA könnten

a) für Proteine kodieren, die mit den benutzten Methoden nicht gefunden wurden. Hier sei daran erinnert, daß 2 amber Mutanten (amber 2 und amber 46) das gleiche Proteinmuster zeigen wie der Wildtyp.
b) Bereiche nicht-essentieller genetischer Information darstellen. Für diese Annahme spricht, daß die Proteinmuster von Deletionsmutanten, denen bis zu 9 % der DNA fehlte, keinen Unterschied aufwiesen zu denen mit Wildtyp infizierten Zellen. Orte ohne genetische Information sind auch Bereiche terminaler Redundanz. Solche Bereiche wurden für SPP1 an den Enden nachgewiesen (Weiss, 1974).

Die Größe, d.h. das Molekulargwicht der gefundenen SPP1 Proteine korreliert in der Regel mit der Anzahl der Mutationsorte, die in diesen Genen isoliert wurden. Für zwei Gene, in denen trotz verhältnismäßig kleiner Genprodukte eine hohe Anzahl von Mutanten

gefunden wurde (Gen 47 und Gen 86), könnte angenommen werden, daß es sich hier um Orte der DNA handelt, die bevorzugt mutieren (sog. hot spots; Benzer, 1961). Die Erklärung hierfür wäre, daß diese Bereiche der in den Phagenkopf verpackten DNA besonders gut zugänglich sind für das Mutagen Hydroxylamin.

Bei der Identifikation von SPP1 Proteinen mit Hilfe von amber Mutanten wurde beobachtet, daß ca. 97 % der amber Peptide nicht mehr in den Gelen auftraten. Es wird daher vermutet, daß durch die Verwendung von amber Mutanten mit niedrigem Revertantensatz für Mutanten selektiert wurde, die in Transkriptionsrichtung am Anfang des Cistrons liegen. Nur für zwei Mutanten, die in verschiedenen Cistren liegen, wurden amber Peptide an Positionen geringeren Molekulargewichts im Gel wiedergefunden.

Der Anteil der SPP1- an der Gesamtproteinsynthese nach Infektion konnte anhand der Gele nur schwer abgeschätzt werden. Durch einen geringeren Einbau von markierten Aminosäuren in B. subtilis Proteine wurde im Vergleich zu E. coli nur ein begrenzter Teil der Wirtsproteine erfaßt. Frühere Untersuchungen über die Transkription von SPP1 (Esche und Spatz, 1973; Milanesi und Casani, 1972) zeigten unter anderem, daß der Anteil der Phagen- an der Gesamt-RNA nach Infektion zu keiner Zeit größer ist als ca. 3o %. Diese Feststellung und die Annahme, daß etwa 8o % der Wirts-RNA nach Infektion ribosomale und t-RNA sind, lassen vermuten, daß der Anteil der SPP1 an der Gesamtproteinsynthese nach Infektion nie mehr als 5o % beträgt.

5.2 Regulation der Genexpression von SPP1

Die nach Infektion von SPP1 induzierten Proteine können nach dem Zeitpunkt ihres Erscheinens in drei Gruppen eingeteilt werden: in Proteine, die 5 min (frühe Proteine), 17 min (späte Proteine), bzw. 25 min (späte Proteine) nach Infektion erscheinen (Abb. 15).

Den 5 min Proteinen gehören 3 Polypeptide an; zwei von ihnen werden im Zeitbereich von 5 bis 17 min nach Infektion gebildet, während die Synthese des 3. Proteins bis zum Eintritt der Lyse nachgewiesen wurde. Nach Infektion mit der pleiotropen Mutante amber 109 und der Hemmung der SPP1 DNA Synthese durch HPUra traten nur diese frühen Phagenproteine auf. Bei der Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Synthese der Phagenproteine nach Infektion mit amber 109 zeigte sich zusätzlich, daß auch das normalerweise spät in der Phagenentwicklung synthetisierte 5 min Protein ab 17 min nach Infektion nicht mehr gebildet wird.

Die Gruppe der 17 min nach Infektion gebildeten Proteine wird durch die 10 Strukturproteine und 4 nichtstrukturelle Proteine vertreten. Einige dieser nichtstrukturellen Proteine sind möglicherweise an der Phagenmorphogenese beteiligt. Alle 14 Proteine dieser Gruppe werden nicht gebildet nach der Infektion mit der pleiotropen Mutante amber 7. Da die Synthese der 25 min Proteine nach amber 7 Infektion unverändert ist, folgt, daß die Synthese der 17 min Proteine nicht essentiell für die Bildung der 25 min Proteine ist.

Zur Gruppe der 25 min nach Infektion erscheinenden Proteine gehören vier Polypeptide. Man könnte sich vorstellen, daß diese Proteine in irgendeiner Weise zur Lyse der Wirtszellen beitragen. Alle späten Proteine (17 min und 25 min Proteine) werden bis zur Lyse synthetisiert.

Das Erscheinen der in 3 Gruppen auftretenden SPP1 Proteine (Abb. 23)

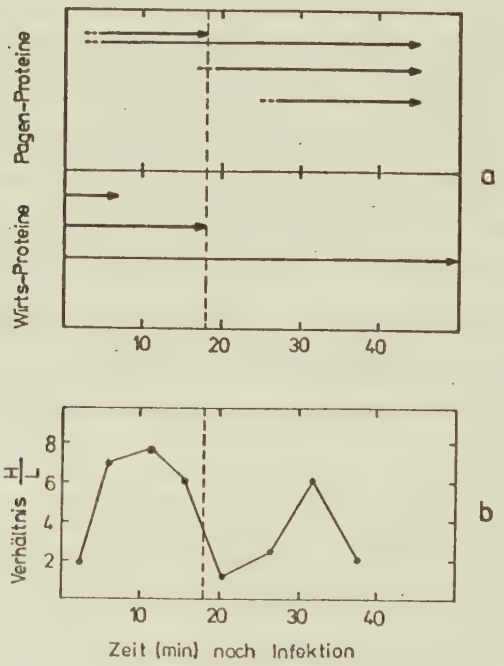

Abbildung 23: (a) Verlauf der Synthese SPP1- und B. subtilis 168-spezifischer Proteine nach Infektion.

(b) Verhältnis der im H- zu der in L-Hybridkomplex gefundenen Radioaktivität nach Hybridisierung von SPP1 spezifischer ^{3}H RNA mit komplementären Einzelsträngen der SPP1 DNA (Esche u. Spatz, 1973)

zeigt eine gewisse Übereinstimmung mit der in früheren Hybridisierungsversuchen gefundenen zeitlichen Transkription von den komplementären DNA-Strängen. Während frühe Gene und einige späte vom H-Strang transkribiert werden, treten zur gleichen Zeit, in der die Gruppe der 17 min Proteine erscheint, mRNAs auf, die dem L-Strang komplementär sind.

Das Zusammentreffen des Matrizenwechsels mit dem Auftreten der ersten späten Proteine und dem gleichzeitigen Abbruch der Synthese von 2 der drei frühen Proteine läßt eine Regulation der SPP1 Gen-Expression auf der Transkriptionsebene durch ein phagenkodiertes positives Kontrollelement vermuten. Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, daß in dieser Arbeit gezeigt wurde, daß SPP1 keine Information für eine komplette eigene RNA Polymerase trägt. Eine Veränderung der Wirtspolymerase durch ein Kontrollelement würde die Affinität der Polymerase zu den Promotoren früher Gene stark herabsetzen und zu der später Gene stark erhöhen. Daß neben der Selektion unterschiedlicher Promotoren durch die Veränderung der RNA Polymerase auch eine Änderung der Matrizenspezifität erreicht wird, wurde bei einer Reihe von E. coli und B. subtilis Phagen (Bautz et al., 1969; Burgess et al., 1969; Goff und Minkley, 1970) nachgewiesen. Einen direkten Hinweis auf einen SPP1-RNA-Polymerase-Faktor oder eine Veränderung des Cor-Enzyms der Wirts-RNA-Polymerase durch Modifikation oder Substitutionen, wie es z. B. für T 4 gezeigt wurde (Zillig et al., 1970; Travers, 1970), gibt es bisher nicht. Die Synthese des 3. frühen Proteins, das auch spät in der Phagenentwicklung gebildet wird, könnte bei der Annahme einer

durch SPP1 Faktoren veränderten Wirts-RNA-Polymerase dadurch erklärt werden, daß einer der späten Promotoren in Transkriptionsrichtung noch vor diesem frühen Gen liegt. In diesem Falle wäre sowohl die unmodifizierte Wirts-RNA-Polymerase früh nach Infektion wie die modifizierte Wirts-RNA-Polymerase spät in der Phagenentwicklung in der Lage, dieses frühe Protein zu transkribieren. Ein solcher positiver Regulationsmechanismus auf der Transkriptionsebene würde auch erklären, weshalb einige B. subtilis Proteine spät nach Infektion nicht mehr gebildet werden.

Aus einer Reihe weiterer Versuche kommt die Aussage, daß die Expression der späten SPP1 Proteine von einer normalen Phagen-DNA-Replikation abhängig ist. Hierfür sprechen folgende Befunde:

1. Wird B. subtilis mit SPP1 infiziert und die Replikation der Phagen-DNA durch HPUra inhibiert, so können mit den verwendeten Techniken keine späten SPP1 induzierten Proteine nachgewiesen werden, Frühe Phagenproteine werden gebildet. HPUra inhibiert sehr wirksam die Wirts-DNA-Synthese und im Gegensatz zu den meisten B. subtilis Phagen auch die Replikation der SPP1 DNA. Ein möglicher sekundärer Effekt von HPUra auf die Transkription und Translation konnte ausgeschlossen werden:
   a) Die Einbaurate von ^{14}C-markierten Aminosäuren in TCA fällbares Protein ist in Gegenwart von HPUra normal.
   b) Das Wirtsenzym Glycerolphosphatdehydrogenase kann 15 min nach Gabe von HPUra noch induziert werden.

Versuche, in denen mit hoher Phagenmultiplizität infiziert wurde und in denen keine späten Proteine gefunden wurden, schlossen aus, daß ein Gendosiseffekt für das Fehlen der späten Phagenproteine nach Hemmung der DNA Replikation verantwortlich ist. Für die frühen Gene war ein Gendosiseffekt deutlich erkennbar.

2. Eine pleiotrope Mutante von SPP1 (amber 109), deren DNA in einem restriktiven Wirt nicht repliziert wird, bildet keine späten Phagenproteine.

Eine replikationsabhängige normale Expression später Gene wird ebenfalls nach Infektion mit dem Coliphagen T 4 (Epstein et al., 1963; Hosoda und Levinthal, 1968; Asdenik und Levinthal, 1970; Riva et al., 1970) und mit dem B. subtilis Phagen SP01 (Gage und Geiduschek, 1971) beobachtet. Alle Untersuchungen dieses Phänomens führten bisher zu keinen eindeutigen Vorstellungen über den molekularen Mechanismus. Für T 4 konnte in letzter Zeit gezeigt werden, daß unter bestimmten Bedingungen auch in Abwesenheit der DNA-Replikation kleine Mengen später Proteine synthetisiert werden können. Dies ist möglich nach Infektion mit einer Dreifachmutante, die Mutationen in den Genen 30 (DNA-Ligase), 46 und 47 (Gene, die Nukleasefunktionen kontrollieren) trägt (Cascino et al., 1971; Berger und Brunner, 1973; Riva et al., 1970). Diese Ergebnisse wurden dahingehend interpretiert, daß zur Transkription später Proteine eine Nukleaseaktivität notwendig ist.

5. 3 Abhängigkeit der SPP1 Entwicklung von Wirtsfunktionen

Die Auswertung von in der SDS-Acrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Extrakten infizierter und nichtinfizierter B. subtilis Zellen weist darauf hin, daß SPP1 die Expression der Wirtsgene und damit die Synthese von Wirtsproteinen nicht wesentlich hemmt. Weiterhin ist eine selektive Hemmung der Wirtsgenexpression durch UV-Licht-Bestrahlung der Zellen vor Infektion und Rifampicingabe nach Infektion nicht möglich. Die Erklärung hierfür ist, daß die Ausprägung einer Reihe von Wirtsfunktionen auch noch nach Infektion für die SPP1 Entwicklung essentiell ist.

Eine der Wirtsfunktionen, von denen SPP1 während seiner ganzen Entwicklung abhängig ist, ist die der Wirts-RNA-Polymerase. Es wurde gezeigt, daß die Transkription von SPP1 Genen in einem rifampicinresistenten Wirt während der ganzen Phagenentwicklung, d.h. auch spät nach Infektion, rifampicin-empfindlich ist. In einer B. subtilis Mutante mit einer rifampicin-resistenten RNA-Polymerase wird das Phagenwachstum dagegen von Rifampicin nicht beeinflußt. Diese Beobachtungen können nur so interpretiert werden, daß SPP1 weder für eine eigene rifampicin-sensitive noch für eine eigene rifampicin-resistente RNA-Polymerase kodiert.

Eine weitere für die Phagenentwicklung wichtige Funktion, für die SPP1 vermutlich nicht kodiert, ist die einer DNA-Polymerase. Hinweise hierfür gaben Experimente, in denen die SPP1-DNA-Synthese

durch das Azopurin Hydroxiphenylazouracil unterbunden wurde. HPUra hemmt spezifisch die semikonservative DNA-Replikation von B. subtilis und im Gegensatz zur DNA-Synthese der meisten B. subtilis Phagen auch die von SPP1. Für SP01 (Yehle und Ganesan, 1972), SP02 c (Rutberg et al., 1972, SP82 (Truffaut et al., 197o) und ø 29 (Schachtele et al., 1971) wurde nachgewiesen, daß sie nach Infektion eine neue DNA-Polymerase-Aktivität induzieren. Von einigen dieser Autoren wird daher vermutet, daß nur die B. subtilis Phagen, die resistent für HPUra sind, für eine eigene DNA-Polymerase kodieren. Die bisher bekannten HPUra-sensitiven B. subtilis Phagen sind ø 1o5 und SPP1.

Eine Evidenz dafür, daß SPP1 den größten Teil der Wirtsgenexpression nicht inhibiert, ist, daß auch noch spät in der Phagenentwicklung ein Wirtsenzym (Glycerolphosphatdehydrogenase), das mit Sicherheit keine Bedeutung für die Phagenentwicklung hat, induziert werden kann.

Diese Resultate erklären auch die schon in früheren Experimenten zur Transkription von SPP1 in vivo (Esche und Spatz, 1973; Milanesi und Cassani, 1972) gemachten Beobachtungen, daß ein hoher Prozentsatz (ca. 7o %) der spät in der Phagenentwicklung auftretenden RNA funktionelle- (mRNA) und stabile Wirts-RNA (rRNA) ist.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß SPP1 im Gegensatz zu dem E. coli oder T-Phagen, die sehr effektiv die makromolekularen Synthesen ihres Wirtes abschalten, zu einer Gruppe von Phagen gezählt werden muß, die die Nukleinsäure-und Proteinsynthese ihres Wirtes nicht wesentlich beeinflussen, wie z. B. øx´174 (Rueckert und Zillig, 1962; Lindquist

und Sinsheimer, 1967), λ (Echols, 1971), ϕ 29 (Schachtele et al., 1970) und SP02c (Kolenbrander et al., 1972).Daraus folgt, daß sich SPP1 offenbar bei voller Funktionstüchtigkeit der Wirtsfunktionen entwickelt. Es kann vermutet werden, daß der Phage nur für Kontrollelemente kodiert, die er für eine zeitlich korrekte Expression seiner Gene benötigt. Eine positive Kontrolle wäre für den Phagen in diesem Falle am ökonomischsten.

6. Literatur

Adesnik, M. and Levinthal, C.: RNA metabolism in T4-infected Escherichia coli. J. Mol. Biol. (1970), 48, 187 - 208.

Bautz, E. K. F., Bautz, F. A., Dunn, J. J.: E. coli sigma factor: a positive control element in phage T4 development. Nature (1969), 223, 1022.

Behncke, M.: Genkonversion bei dem B. subtilis Phagen SPP1. Untersuchungen von Heteroduplices aus komplementären DNA-Strängen mit Wildtyp- und konditional-letalem Mutantengenotyp. Dissertation, Fachbereich Biologie, Freie Universität Berlin (1973).

Benzer, S.: On the topography of the genetic fine structure. Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) (1961), 47, 403 - 426.

Berger, T. and Brunner, R.: Late gene function in bacteriophage T4 in the absence of phage DNA replication. J. Mol. Biol. (1973), 74, 743 - 747.

Bishop, D. H. L., Claybrook, J. R., Spiegelman, S.: Electrophoretic separation of viral nucleic acids on polyacrylamid gels. J. Mol. Biol. (1967), 26, 373.

Brown, N.: 6-(p-Hydroxyphenylazo)-uracil: a selective inhibitor of host DNA replication in phage-infected Bacillus subtilis. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. (1970), 67, 1454 - 1461.

Brown, N.: Inhibition of bacterial DNA replication by 6-(p-Hydroxyphenylazo) uracil: differential effect on repair and semiconservative synthesis in Bacillus subtilis. J. Mol. Biol. (1971), 59, 1 - 16.

Brown, N., Wisseman, C. L. and Matsushita, T.: Inhibition of bacterial DNA replication by 6-(p-Hydroxyphenylazo)-uracil. Nature N. Biol. (1972), 237, 72 - 74.

Burgess, A. B. and Denhardt, D. T.: Studies on ϕx 174 proteins. I. Phage-specific proteins synthesized after infection of E. coli. J. Mol. Biol. (1969), 44, 377 - 386.

Burgess, R. R., Travers, A. A., Dunn, J. J. and Bautz, E. K. F.: A factor stimulating transcription by RNA polymerase. Nature (1969), 223, 476.

Cascino, A., Geiduschek, E. P., Cafferata, R. L. and Haselkorn, R.: T4 DNA replication and viral gene expression. J. Mol. Biol. (1971), 61, 357 - 367.

Cummings, D. J., Chapman, V. A. and DeLong, S. S.: Disruption of T-even bacteriophages by Dimethyl-Sulfoside. J. of Virology (1968), 2, 610 - 620.

Epstein, R. H., Bolle, A., Steinberg, C. M., Kellenberger, E., Box de la Tour, E., Chevalley, R., Edgar, R. S., Susman, M., Denhardt, G. H. and Lielausis, A.: Physiological studies of conditional lethal mutants of bacteriophage T4D. Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol. (1963), 28, 375 - 394.

Esche, H. and Spatz, H. Ch.: Asymmetric transcription of SPP1 in vivo. Molec. gen. Genet. (1973), 124, 57 - 63.

Földes, J. and Trautner, T. A.: Infectious DNA from a newly isolated B. subtilis phage. Z. Vererbungsl. (1964), 95, 57 - 65.

Gage, L. P. and Geiduschek, E. P.: RNA synthesis during bacteriophage SP01 development. II. Sense modulations and prerequisites of the transcription program. Virology (1971), 44, 200 - 210.

Gelfand, D. H. and Hayashi, M.: Electrophoretic characterization of ϕx 174-specific proteins. J. mol. Biol. (1969), 44, 501 - 516.

Goff, C. G. and Minkley, E.: The RNA polymerase sigma factor: a specificity determinant. In (L. Silvestri, ed.) Lepetit Colloq. on RNA polymerase and transcription. North-Holland Publ. Co., Amsterdam (1970), p. 124.

Hosoda, J. and Levinthal, C.: Protein synthesis by Escherichia coli infected with bacteriophage T4D. Virology (1968), 34, 709 - 727.

Kahmann, R.: Das Verhalten von SPP1 DNA nach Transfektion von B. subtilis. Dissertation, Fachbereich Biologie, Freie Universität Berlin (1974).

Klotz, G. and Spatz, H. Ch.: A biological assay for intracellular phage-DNA. Molec. gen. Genet. (1971), 110, 367 - 373.

Kolenbrander, P. E., Hemphill, H. E. and Whiteley, H. R.: Nucleic acid synthesis in bacteriophage SP02 ci-infected Bacillus subtilis. J. Virol. (1972), 9, 776 - 784.

Kozloff, L. M.: A biochemistry of the T-even bacteriophage of Escherichia coli. In: Molecular basis of virology. Ed. by Fraenkel-Conrat, H., New York: Reinhold Book Corp. (1968).

Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London) (1970), 227, 680 - 685.

Lin, E. C. C., Koch, J. P., Chused, T. M. and Jorgensen, S. E.: Utilization of L-α-glycerophosphate by Escherichia coli without hydrolysis. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. (1962), 48, 2145 - 2150.

Lindgren, V. and Rutberg, L: Glycerol metabolism in B. subtilis: Gene-enzyme relations.

Lindquist, B. H. and Sinsheimer, R. L.: Process of infection with bacteriophage ϕx174. XIV. Studies on macromolecular synthesis during infection with a lysis-defective mutant. J. Mol. Biol. (1967), 28, 87 - 94.

Loening, U. E.: The determination of the molecular weight of ribonucleic acid by polyacrylamid-gel electrophoresis. Biochem. J. (1969), 113, 131 - 138.

Maizel, J. V.: Acrylamid gel electrophoresis of proteins and nucleic acid. Methods in Virology (1971), 5, 179 - 246.

Maizel, J. V.: Acrylamid gel electrophoresis of proteins and nucleic acid. In: Fundamental techniques in Virology. Ed. by K. Habel and N. P. Salzman (1969), Chapter 32, 334 - 362, Academic Press, N. Y.

Marcus, M. and Newlon, M. C.: Control of DNA synthesis in B. subtilis by phage ϕe. Virology (1971), 44, 83 - 93.

Mendez, E., Ramirez, G., Salas, M. and Vinuela, E.: Structural proteins of bacteriophage ϕ29. Virology (1971), 45, 567 - 576.

Milanesi, G. and Cassani, G.: Transcription after bacteriophage SPP1 infection in B. subtilis. J. Virology (1972), 10, 187 - 192.

Okubo, S. and Yanagida, T.: Isolation of a suppressor mutant in B. subtilis. J. Bacteriol. (1968), 95, 1187 - 1188.

Price, A. R. and Fogt, S. M.: Resistance of bacteriophage PBS2 infection to 6-(p-Hydroxyphenylazo)-uracil, an inhibitor of Bacillus subtilis deoxyribonucleic acid synthesis. J. of Virology (1973), 11, 338 - 340.

Schachtele, C. F., Hagen, E. W. and Anderson, D. L.: Temperature-shift analysis of bacteriophage ϕ29 gene expression in Bacillus amyloliquefacien J. Virology (1971), 8, 352 - 354.

Schachtele, C. F., Reilly, B. E., DeLain, C. V., Whittington, M. O., and Anderson, D. L.: Selective replication of bacteriophage ϕ29 deoxyribonucleic acid in 6-(p-Hydroxyphenylazo)-uracil-treated Bacillus subtilis. J. of Virology (1973), 11, 153 - 155.

Schlaeger, E. J.: Das Ausmaß der DNA-Reparatursynthese während der primär-Rekombination bei Transfektion mit Bacillus subtilis. Dissertation Fakultät für Biologie, Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg (1973).

Spatz, H. Ch. and Trautner, T. A.: The role of recombination in transfection of B. subtilis. Molec. Gen. Genet. (1971), 113, 174 - 190.

Spatz, H. Ch. and Trautner, T. A.: One way to do experiments on gene conversion? Molec. Gen. Genet. (1970), 109, 84 - 106.

Spizizen, J.: Transformation of biochemically deficient strains of Bacillus subtilis by deoxyribonucleate. Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) (1958), 44, 1072 - 1078.

Studier, F. W. and Maizel, J.: T7 directed protein synthesis. Virology (1969), 575 - 586.

Studier, F. W.: Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels. J. Mol. Biol. (1973), 79, 237 - 248.

Riva, S., Polsinelli, M. and Falaschi, A.: A new phage of Bacillus subtilis with infectious DNA having separable strands. J. Mol. Biol. (1968), 35, 347 - 356.

Riva, S. C.: Transcription of B. subtilis phage SPP1 DNA in vitro. Biochem. Biophys. Res. Commun. (1969), 34, 824 - 830.

Riva, S., Cascino, S., and Geiduschek, E. P. : Coupling of late transcription to viral replication in bacteriophage T4 development. J. Mol. Biol. (1970), 54, 85 - 102.

Riva, S., Cascino, A. and Geiduschek, E. P.: Uncoupling of late transcription from DNA replication in bacteriophage T4 development. J. Mol. Biol. (1970), 54, 103 - 119.

Rutberg, L., Armentrout, R. W. and Jonasson, J.: Unrelatedness of temperate Bacillus subtilis bacteriophages SP02 and ϕ105. J. Virol. (1972), 9, 732 - 737.

Rueckert, R. R. and Zillig, W.: Biosynthesis of virus protein in Escherichia coli C in vivo following infection with bacteriophage ϕx174. J. Mol. Biol. (1962), 5, 1 - 9.

Tessman, J.: Mutagenic treatment of double- and single-stranded DNA phages T4 and S13 with hydroxylamine. Virology (1968), 35, 331 - 333.

Trautner, T. A., Pawlek, B., Bron, S. and Anagnostopoulos, C.: Restriction and modification in B. subtilis. Molec. Gen. Genet. (1974), 131, 181 - 191.

Travers, A.: RNA polymerase and T4 development. Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol. (1970), 35, 241 - 251.

Truffant, N. Revet, B. and Soulie, M.: Etude comparative des DNA de phage 2C, SP8, SP82, ϕe, SP01, et SP50. Eur. J. Biochem. (1970), 15, 391 - 400.

Yehle, C. O. and Ganesan, A. T.: Deoxyribonucleic acid synthesis in bacteriophage SP01-infected Bacillus subtilis. I. Bacteriophage deoxyribonucleic acid synthesis and the fate of host deoxyribonucleic acid in normal and polymerase deficient strains. J. Virology (1972), 9, 263 - 272.

Zillig, W., Zechel, K., Rabussay, D., Schachner, M., Sethi, V. S., Palm, P., Heil, A. and Seifert, W.: On the role of different subunits of DNA-dependent RNA polymerase from E. coli in the transcription process. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. (1970), 35, 47 - 58.

Weiss, S.: Zur Struktur der DNA von SPP1. Diplomarbeit, Fachbereich Biologie, Freie Universität Berlin (1974).

Lebenslauf

Am 19.2.1942 wurde ich als Sohn des Diplom-Ingenieurs Carl-Gustav Esche und seiner Ehefrau Ruth, geb. Genschmer, in Berlin geboren. Nach sechs Jahren Grund- und vier Jahren Oberschule verließ ich 1959 die Schule mit dem Zeugnis der Mittleren Reife. Anschließend absolvierte ich ein zweijähriges Ingenieurschulpraktikum bei der Firma Siemens, Berlin. Nach dem Besuch einer Abendschule legte ich 1964 die Reifeprüfung für Schulfremde beim Senator für Schulwesen in Berlin ab. Im gleichen Jahr begann ich an der Freien Universität Berlin mit dem Studium der Medizin und wechselte nach 6 Semestern zur math.-nat. Fakultät über zum Studium der Allgemeinen Biologie und Genetik. Die Diplomprüfung in diesem Fach legte ich 1972 ab; die Diplomarbeit wurde am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik durchgeführt. Anschließend begann ich mit meiner Dissertation am selben Institut.